

Universität Rostock



Traditio et Innovatio

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene
der Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Herr Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Andreas Podbielski

**Untersuchung der Wirkung von kaltem
Atmosphärendruckplasma auf Biofilme von
*Staphylococcus epidermidis***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor rerum humanarum (Dr. rer. hum.)

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Katharina Ekat, geb. 31.01.1988 in Rostock

aus Rostock

Rostock, 2018

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00002431

Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Bernd Kreikemeyer, Universitätsmedizin Rostock, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

PD Dr. rer. nat. Kirsten Peters, Universitätsmedizin Rostock, Arbeitsbereich Zellbiologie

Prof. Dr. rer. nat. Thomas von Woedtke, Greifswald, Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie

Jahr der Einreichung: 2018

Jahr der Verteidigung: 2019

Inhalt

Inhalt	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Implantat assoziierte Infektionen nach künstlichem Gelenkersatz	1
1.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	2
1.3 Biofilmbildung von <i>S. epidermidis</i> auf Implantatoberflächen	3
1.4 Antibiotikaresistenz von <i>S. epidermidis</i> Biofilmen	7
1.5 Physikalisches Plasma	8
1.6 Antimikrobielle Eigenschaften kalter Atmosphärendruckplasmen	10
1.7 Zielstellung	12
2 Material und Methoden	14
2.1 Materialien	14
2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Antibiotika	14
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	16
2.1.3 Laborgeräteausstattung und Software	17
2.2 Plasma-Quellen	19
2.3 Bakterienstämme	22
2.4 Kulturmedien, Puffer und Lösungen	23
2.5 Bakterien-Kultivierung und Stammhaltung	23
2.6 Biofilmbildung von <i>S. epidermidis</i> auf TiAlV-Oberflächen unter statischen Bedingungen	24
2.7 Charakterisierung von Biofilmen von <i>S. epidermidis</i> auf TiAlV-Oberflächen	24
2.7.1 Vitalitätsuntersuchung mittels Lebendkeimzahlbestimmung (LKZ)	24
2.7.2 Vitalitätsuntersuchung nach Lebend/tot-Färbung mittels Fluoreszenz-Mikroskopie	25

2.7.3	Quantifizierung der Biofilmmasse mittels Kristall-Violett-Färbung	26
2.7.4	Darstellung der Biofilm-Morphologie mittels Raster-Elektronenmikroskopie (REM).....	26
2.8	Plasmabehandlung von Biofilmen	27
2.9	Untersuchung der Revitalisierung von <i>S. epidermidis</i> Biofilmen nach Plasma-Behandlung	29
2.10	Wachstumskinetik von <i>S. epidermidis</i> nach Plasma-Behandlung der Biofilme	29
2.11	Untersuchung der Empfindlichkeit von <i>S. epidermidis</i> gegenüber ausgewählter Antibiotika nach Plasma-Behandlung	30
2.11.1	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Ampicillin, Erythromycin und Gentamicin	31
2.11.2	Untersuchung zur Empfindlichkeit des Biofilms von <i>S. epidermidis</i> in Anwesenheit von Gentamicin-Sulfat nach Plasma-Behandlung.....	32
2.11.3	Revitalisierung der Biofilme von <i>S. epidermidis</i> nach Plasma-Behandlung in Anwesenheit von Gentamicin-Sulfat	32
2.11.4	Untersuchung der Empfindlichkeit von <i>S. epidermidis</i> nach Plasma-Behandlung gegenüber ausgewählter Antibiotika im planktonischen Zustand	32
2.12	Untersuchung zur Resistenz von <i>S. epidermidis</i> RP62A gegenüber kaltem Atmosphärendruckplasma	33
2.13	Statistische Analysen	34
3	Ergebnisse.....	35
3.1	Plasmabehandlung von Biofilmen	35
3.1.1	Antimikrobielles Potential verschiedener Plasma-Quellen	35
3.1.2	Wirkung von kaltem Plasma auf die Vitalität von <i>S. epidermidis</i> innerhalb des Biofilms.....	39
3.1.3	Revitalisierung von <i>S. epidermidis</i> innerhalb des Biofilms nach Plasma-Exposition.....	43
3.2	Untersuchung der Empfindlichkeit von <i>S. epidermidis</i> gegenüber ausgewählter Antibiotika nach Plasma-Behandlung	47
3.2.1	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Gentamicin nach Plasma-Exposition.....	47

3.2.2	Untersuchung zur Empfindlichkeit des Biofilms von <i>S. epidermidis</i> in Anwesenheit von Gentamicin-Sulfat nach Plasma-Behandlung.....	49
3.2.3	Revitalisierung des Biofilms von <i>S. epidermidis</i> in Anwesenheit von Gentamicin-Sulfat nach Plasma-Behandlung.....	53
3.2.4	Untersuchung der Empfindlichkeit von <i>S. epidermidis</i> nach Plasma-Behandlung gegenüber ausgewählten Antibiotika im planktonischen Zustand	57
3.2.5	Untersuchung zur Resistenz von <i>S. epidermidis</i> RP6A gegenüber kaltem Atmosphärendruckplasma	64
4	Diskussion	68
4.1	Charakterisierung verschiedener Plasma-Quellen hinsichtlich ihres antimikrobiellen Potentials	68
4.2	Charakterisierung des antimikrobiellen Potentials des kINPen08 auf Biofilme von <i>S. epidermidis</i> auf TiAlV-Oberflächen	71
4.3	Revitalisierung der Biofilme von <i>S. epidermidis</i> auf TiAlV-Oberflächen nach Plasma-Exposition.....	74
4.4	Empfindlichkeit von <i>S. epidermidis</i> im Biofilm auf TiAlV-Oberflächen nach Plasma-Exposition gegenüber ausgewählten Antibiotika.....	76
4.5	Revitalisierung von <i>S. epidermidis</i> im Biofilm auf TiAlV-Oberflächen nach kombinierter Plasma- und Gentamicin-Behandlung	80
4.6	Empfindlichkeit von <i>S. epidermidis</i> nach Plasma-Behandlung gegenüber ausgewählten Antibiotika im planktonischen Zustand	80
4.7	Empfindlichkeit von <i>S. epidermidis</i> nach Plasma-Behandlung gegenüber oxidativem Stress.....	83
5	Ausblick	86
6	Zusammenfassung.....	88
7	Literaturverzeichnis	XI
7.	Anhang.....	XXXIV
7.1.	Abbildungen	XXXIV
8.	Danksagung.....	LVIII

Abkürzungsverzeichnis

μ	Wachstumsrate [h^{-1}]
AMPs	Antimikrobielle Peptide
<i>Aqua dest.</i>	Destilliertes Wasser
Atl	Autolysine
bzw.	Beziehungsweise
CFU	Colony Forming Units
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy (konfokale Laser-Raster Mikroskopie)
CWA	Cell-Wall-Anchor (Zellwand verankerte Proteine)
DBD/ DBE	Dielectric Barrier Discharge/ Dielektrisch behinderte Entladung
DNA	Desoxyribonukleinsäure/acid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix
EPS	Extrapolymere Substanz
et al.	et alii
GM	Gentamicin
IMIKRO	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene
INP	Leibnitz-Institut für Plasmaforschung und Technologie Greifswald
KBE	Kolonien-bildende Einheiten
MGE	Mobile genetische Elemente
MHK	Minimale Hemmkonzentration [$\mu\text{g/ml}$]
Mio.	Millionen
MSCRAMMS	microbial surface components recognizing adhesive matrix mole- cules
n. d.	Nicht detektierbar
OD	Optische Dichte

<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	Phosphate Buffered Saline
PGA	poly-γ-glutamic acid
PNAG/PIA	Polysaccharide intercellular adhesins, poly-N-acetylglucosamine homopolymer
RBE	Resistive Barriere Entladung
REM	Raster-Elektronenmikroskopie
RNS	Reaktive Nitrogen Species (reaktive Stickstoffspezies)
ROS	Reaktive Oxygen Species (reaktive Sauerstoffspezies)
Rz	Gemittelte Rautiefe
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
slm	Standard-Liter pro Minute
SSP	Surface-Structure Proteins (Oberflächenproteine)
TCPS	Tissue Culture Polystyrol
t_d	Verdopplungszeit [h]
Ti6Al4V	Titan-6 Aluminium-4 Vanadium
TSB	Tryptic Soy Broth
u. a.	unter anderem
UV-Strahlung	Ultraviolett-Strahlung
v/v	volume per volume
VBNC	Viable But Not Culturable
w/v	weight per volume
WHO	World Health Organisation
z. B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der aufeinanderfolgenden Phasen der Biofilmbildung <i>in vitro</i> .	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Virulenzfaktoren (Adhäsionsmoleküle und Biofilmbildung) von <i>S. epidermidis</i> .	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung der vier wichtigsten Phasen der Biofilmbildung am Beispiel einer Implantat-Infektion.	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Erzeugung kalter Plasmen.	9
Abbildung 5: Schematische Darstellung einer kINPen Plasma-Quelle.	20
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Versuchsabläufe während der Plasma-Behandlung von Biofilmen von <i>S. epidermidis</i> .	28
Abbildung 7: Exemplarische Darstellung der MHK-Bestimmung mittels E-Test.	31
Abbildung 8: Darstellung Behandlungsschema Plasma-Resistenz-Test modifiziert nach Mai-Prochnow et al. 2015.	34
Abbildung 9: Darstellung der Lebendkeimzahlen	35
Abbildung 10: Zusammenfassende Fluoreszenzmikroskopische Darstellung.	37
Abbildung 11: REM-Aufnahmen zur Untersuchung der Morphologie.	38
Abbildung 12: Darstellung der Lebendkeimzahlen	40
Abbildung 13: Darstellung der Biofilmmassen Quantifizierung	41
Abbildung 14: Mikroskopische Darstellung der Biofilme nach Plasma-bzw. Gasgemisch-Exposition.	42
Abbildung 15: REM-Aufnahmen der Biofilm-Morphologie nach Plasma- bzw. Gas-Exposition für eine bzw. drei Minuten.	42
Abbildung 16: Darstellung der Lebendkeimzahlen nach Revitalisierung in TSB-Medium für 24 h.	44
Abbildung 17: Darstellung der Biofilmmassen Quantifizierung	45
Abbildung 18: Mikroskopische Darstellung der Biofilme nach Plasma-bzw. Gasgemisch-Exposition und erneuter Kultivierung für 24 h in TSB-Medium.	46
Abbildung 19: REM-Aufnahmen der Biofilm-Morphologie nach Plasma- bzw. Gas-Exposition für eine bzw. drei Minuten und Revitalisierung für 24 h.	46
Abbildung 20: MHK-Bestimmung von Gentamicin gegen <i>S. epidermidis</i> RP62A.	48
Abbildung 21: Darstellung der Lebendkeimzahlen nach Inkubation in TSB-Medium und GM-Sulfat für 24 h	49
Abbildung 22: Darstellung der Biofilmmassen Quantifizierung	50

Abbildung 23: Mikroskopische Darstellung der Biofilme nach Plasma-bzw. Gasgemisch-Exposition und erneuter Kultivierung für 24 h in TSB-Medium und GM-Sulfat (GM).....	52
Abbildung 24: REM-Aufnahmen der Biofilm-Morphologie nach Plasma- bzw. Gas-Exposition für eine bzw. drei Minuten und Kultivierung in TSB-Medium und GM-Sulfat für 24 h.....	52
Abbildung 25: Darstellung der Lebendkeimzahlen nach Revitalisierung.....	54
Abbildung 26: Darstellung der Biofilmmassen Quantifizierung	55
Abbildung 27: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Biofilme nach Lebend-Tot-Färbung.	56
Abbildung 28: REM-Aufnahmen der Biofilm-Morphologie nach Plasma- bzw. Gas-Exposition für eine bzw. drei Minuten und Kultivierung in TSB-Medium und GM-Sulfat für 24 h mit anschließender Revitalisierung.	56
Abbildung 29: MHK-Bestimmung von Ampicillin gegen <i>S. epidermidis</i> RP62A.....	58
Abbildung 30: Wachstumskinetik von <i>S. epidermidis</i> aus den Biofilmen nach Plasma-bzw. Gas-Exposition über 24 h.....	59
Abbildung 31: Plasma-Resistenz-Test.	65
Abbildung 32: Kontrolle TiAlV.....	XXXV
Abbildung 33: Plasma 1 min.....	XXXVI
Abbildung 34: Plasma 3 min.....	XXXVII
Abbildung 35: Gasgemisch 1 min.....	XXXVIII
Abbildung 36: Gasgemisch 3 min.....	XXXIX
Abbildung 37: Revitalisierung nach Plasma 1 min.....	XL
Abbildung 38: Revitalisierung nach Plasma 3 min.....	XLI
Abbildung 39: Revitalisierung nach Gasgemisch 1 min.....	XLII
Abbildung 40: Revitalisierung nach Gasgemisch 3 min.....	XLIII
Abbildung 41: Plasma 1 min und Kultivierung mit Gentamicin.....	XLIV
Abbildung 42: Plasma 3 min und Kultivierung mit Gentamicin.....	XLV
Abbildung 43: Revitalisierung Plasma 1 min und Kultivierung mit Gentamicin.....	XLVI
Abbildung 44: Revitalisierung Plasma 3 min und Kultivierung mit Gentamicin.....	XLVII
Abbildung 45: Revitalisierung Gasgemisch 1 min und Kultivierung mit Gentamicin.....	XLVIII
Abbildung 46: Revitalisierung Gasgemisch 3 min und Kultivierung mit Gentamicin.....	XLIX
Abbildung 47: Wachstumskinetiken nach Plasma-bzw. Gas-Exposition.....	LI
Abbildung 48: Wachstumskinetiken nach Plasma-bzw. Gas-Exposition.....	LII
Abbildung 49: Wachstumskinetiken nach Plasma-bzw. Gas-Exposition.....	LV
Abbildung 50: Wachstumskinetiken nach Plasma-bzw. Gas-Exposition.....	LVII

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien, Enzyme, Antibiotika und Kits	14
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	16
Tabelle 3: Laborgeräte	17
Tabelle 4: Software	19
Tabelle 5: Charakteristische Parameter der verwendeten Plasma-Quellen.	20
Tabelle 6: Verwendete Bakterienstämme	22
Tabelle 7: Kulturmedien, Puffer und Lösungen	23
Tabelle 8: Auszug Antibiogramm <i>S. epidermidis</i> RP62A.	30
Tabelle 9: Darstellung der Wachstumsraten [h^{-1}] und Verdopplungszeiten [h] von <i>S. epidermidis</i> nach Plasma-bzw. Gas-Exposition im Biofilm	60
Tabelle 10: Darstellung der Wachstumsraten [h^{-1}] von <i>S. epidermidis</i> nach Plasma-bzw. Gas-Exposition im Biofilm unter Einfluss von je 1 $\mu\text{g/ml}$ bis 1000 $\mu\text{g/ml}$ Gentamicin.	60
Tabelle 11: Darstellung Verdopplungszeiten [h] von <i>S. epidermidis</i> nach Plasma-bzw. Gas-Exposition im Biofilm unter Einfluss von 1 $\mu\text{g/ml}$ bis 1000 $\mu\text{g/ml}$ Gentamicin	61
Tabelle 12: Darstellung der Wachstumsraten [h^{-1}] von <i>S. epidermidis</i> nach Plasma-bzw. Gas-Exposition im Biofilm unter Einfluss von je 1 $\mu\text{g/ml}$ bis 1000 $\mu\text{g/ml}$ Erythromycin.	62
Tabelle 13: Darstellung Verdopplungszeiten [h] von <i>S. epidermidis</i> nach Plasma-bzw. Gas-Exposition im Biofilm unter Einfluss von 1 $\mu\text{g/ml}$ bis 1000 $\mu\text{g/ml}$ Erythromycin	62
Tabelle 14: Darstellung der Wachstumsraten [h^{-1}] von <i>S. epidermidis</i> nach Plasma-bzw. Gas-Exposition im Biofilm unter Einfluss von je 1 $\mu\text{g/ml}$ bis 1000 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin.	63
Tabelle 15: Darstellung Verdopplungszeiten [h] von <i>S. epidermidis</i> nach Plasma-bzw. Gas-Exposition im Biofilm unter Einfluss von 1 $\mu\text{g/ml}$ bis 1000 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin.	63
Tabelle 16: Plasma-Resistenz-Test	67
Tabelle 17: Plasma-Resistenz-Test	67

1 Einleitung

1.1 Implantat assoziierte Infektionen nach künstlichem Gelenkersatz

Der künstliche Gelenkersatz ist als Therapie in Orthopädie und Unfallchirurgie als Standard etabliert. Viele traumatische, degenerative und entzündliche Erkrankungen können mit Hilfe des künstlichen Gelenkersatzes behandelt und rekonstruiert werden (Gollwitzer und Gerdesmeyer 2006). Mit weltweit etwa 1,5 Mio. Implantationen pro Jahr stellt die Hüftendoprothetik eine der erfolgreichsten orthopädischen Rekonstruktionen dar (Haenle et al. 2012). In Deutschland liegt die Zahl der Erstimplantationen für eine Hüftendoprothese jährlich bei ca. 210.000 (Statistisches Bundesamt 2017). Implantatversagen auf Grund einer Implantat-assoziierten Infektion (periprotetische Infektion) stellt dabei eine schwerwiegende und komplexe Komplikation nach künstlichem Gelenkersatz dar. Trotz verbesserter Infektionsprophylaxe durch Reinraumtechnik in den Operationssälen, peri – und postoperativer Antibiotikagabe, Verkürzung der Operationszeiten und dem Einsatz antimikrobieller Implantatoberflächen liegt das Risiko einer periprotetischen Infektion nach primärer Hüftendoprothese zwischen 0,5–2 %. Nach Revision dieser primären Implantate steigt das Risiko auf 4–6 %. Eine erneute Revision hingegen steigert das Infektionsrisiko auf bis zu 20 %. Neben den damit verbundenen physischen und psychischen Belastungen für den Patienten, stellen Implantat-assoziierte Infektionen auch eine enorme finanzielle Belastung für das Gesundheitssystem dar. Die Kosten für die Sanierung einer periprotetischen Infektion in deutschen Kliniken belaufen sich dabei auf ca. 30.000 Euro pro Patient (Haenle et al. 2012).

Entsprechend des Auftretens einer periprotetischen Infektion wird zwischen Frühinfektion (< 2 Monate nach Implantation), verzögerter Infektion (> 2 Monate nach Implantation) sowie Spätinfektion (> 1 Jahr nach Implantation) unterschieden (Tsukayama et al. 1996; Lehner et al. 2009). Die Entstehung einer periprotetischen Infektion erfolgt meist exogen über die Haut des Patienten. Auch das Operationsfeld, die chirurgische Ausrüstung oder das Operationspersonal stellen mögliche exogene Infektionsquellen dar (Taher et al. 2015). Frühe oder verzögerte Infektionen sind in den meisten Fällen auf während oder kurz nach der Operation eingebrachte Bakterien zurückzuführen (Gollwitzer und Gerdesmeyer 2006). Eine Infektion über hämatogene Übertragungswege bzw. andere Infektionsquellen des Patienten wie z. B. Harnwegs- oder Atemwegsinfektionen sind weitaus seltener (Lehner et al. 2009). Verschiedene patientenspezifische Faktoren beeinflussen Entstehung und Ausprägung einer periprotetischen Infektion. So spielen neben der Immunkompetenz des Patienten auch Faktoren wie Diabetes, Alter, Tabak- und Alkoholkonsum, Adipositas oder auch Dauer des Krankenhausaufenthalts eine wichtige Rolle (Bühler et al. 2003; Pulido et al. 2008; Bozic et al. 2012).

Die erfolgreiche Behandlung periprothetischer Infektionen ist auf Grund wiederkehrender bakterieller Belastungen des Implantats und der Ausbildung bakterieller Biofilme mehrstufig und meist langwierig. Neben der Ausbildung eines bakteriellen Biofilms auf der Implantatoberfläche kommt erschwerend hinzu, dass viele der beteiligten Spezies diverse Antibiotikaresistenzen erworben haben. So wurde nachgewiesen, dass bis zu 45 % der isolierten *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) und 85 % der *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) Isolate bei periprothetischen Infektionen Methicillin-resistent sind (Garvin et al. 1999; Kaye et al. 2004). Eine komplette Revision des Implantats nach Infektion ist in den meisten Fällen die einzige Möglichkeit zur Eindämmung der Infektion. Dabei zeigt die zweizeitige Revision von Prothesen nach periprothetischer Infektion noch immer die besten Heilungschancen (Darouiche 2004; Kurtz et al. 2012). Durch die Entfernung der infizierten Prothese und Einsatz der neuen Prothese durch zwei unterschiedliche Eingriffe ist es möglich, die Infektion einzudämmen. Eine adäquate Reinigung der Wunde mit Debridement und systemischer Antibiotikagabe sowie dem Einsatz eines temporären Platzhalters mit lokaler Antibiotika-Depotwirkung sind dabei die Voraussetzung für die Infektionseindämmung. Bei Keimfreiheit der Wunde sowie der Interimsprothese wird diese entfernt und gegen eine neue lasttragende Prothese ersetzt (Zimmerli 2015; Chen et al. 2017).

1.2 *Staphylococcus epidermidis*

Ein weites Spektrum von Mikroorganismen ist ursächlich an der Entstehung periprothetischer Infektionen beteiligt. Dabei sind die am häufigsten isolierten Mikroorganismen Staphylokokken, insbesondere Koagulase-negative Staphylokokken wie *S. epidermidis* (30–43 %), aber auch *S. aureus* (12–23 %). Weiterhin konnten Streptokokken (9–10 %), Enterokokken (3–7 %), gram-negative Erreger (3–6 %) und andere anaerobe Bakterien (2–4 %) als häufige kausale Infektionserreger nachgewiesen werden (Schäfer et al. 2008; Zimmerli und Moser 2012; Lamagni et al. 2015).

S. epidermidis ist als Kommensale der menschlichen Haut bekannt. Durch Konkurrenz mit potentiell schädlichen Mikroorganismen, spielt *S. epidermidis* eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung eines gesunden Haut-Mikrobioms. Als Pathobiont hingegen, tritt *S. epidermidis* bei einer Reihe nosokomialer Infektionen, insbesondere Implantat-assoziiierter Infektionen auf. Vielmehr kommt es erst durch das Einbringen eines Fremdkörpers, in diesem Fall eines medizinischen Implantates, zur Infektion mit *S. epidermidis* und somit zu seiner raschen Adhäsion und Akkumulation auf der Implantatoberfläche (Sabaté Brescó et al. 2017).

S. epidermidis gehört zu den sogenannten Koagulasenegativen Staphylokokken, ist grampositiv, unbeweglich und bildet keine Sporen aus (Otto 2009, 2012). Auf Grund seines kom-

mensalen Charakters, besitzt *S. epidermidis* eine Vielzahl von Mechanismen, um dem menschlichen Immunsystem, aber auch physikalischen und chemischen Schädigungen auszuweichen. Dazu zählen Oberflächenmoleküle zur Adhäsion an den Wirt oder abiotische Oberflächen, Systeme zur Erkennung von antimikrobiellen Peptiden (AMPs) der Immunantwort, Moleküle zur Kommunikation und Strategien zum Überleben unter Temperaturbelastung sowie osmotischem und mechanischem Stress (Lai et al. 2007; Li et al. 2007; Coates et al. 2014; Joo und Otto 2015; N'Diaye et al. 2016). So exprimiert *S. epidermidis* protektive Expolymere wie PGA (poly- γ -glutamic acid) und PNAG/PIA (poly-N-acetylglucosamine homopolymer), um sich vor den Mechanismen der angeborenen Wirts-Immunantwort wie Phagocytose durch Neutrophile oder AMPs zu schützen (Otto 2009). Aber auch die Ausbreitung anderer Mikroorganismen wird durch *S. epidermidis* beeinflusst. So konnte gezeigt werden, dass das Wachstum von *S. aureus* negativ durch das Wachstum von *S. epidermidis* beeinflusst wird (Frank et al. 2010; Iwase et al. 2010; Park et al. 2011; Sullivan et al. 2016). Der Grund dafür sind u. a. sogenannte Phenol lösliche Moduline (PSMs) und Bakteriocine, die durch *S. epidermidis* sezerniert werden (Bastos et al. 2009; Wang et al. 2011; Hassan et al. 2012; Otto 2014) und ähnlich strukturiert sind wie AMPs der menschlichen Immunabwehr. Aber auch Proteasen und Stoffwechselprodukte von *S. epidermidis* wirken dem Wachstum anderer Mikroorganismen entgegen. Somit erklärt sich auch der monomikrobielle Charakter bei Infektionen mit *S. epidermidis*, insbesondere bei periprothetischen Infektionen (Zimmerli und Moser 2012). Im Gegensatz zu *S. aureus* besitzt *S. epidermidis* nur eine begrenzte Anzahl an bisher bekannten Virulenzfaktoren, sodass *S. epidermidis*-Infektionen im gesunden Wirt von eher chronischer Natur sind (Gill et al. 2005; Heilmann und Götz 2013).

1.3 Biofilmbildung von *S. epidermidis* auf Implantatoberflächen

Im Allgemeinen können zwei Formen mikrobieller Lebensweise unterschieden werden: Planktonische Populationen und Biofilme. Der von Costerton und Kollegen geprägte Begriff „Biofilm“ beschreibt eine strukturierte, koordinierte, funktionelle Gemeinschaft von Mikroorganismen (ca. 15 – 20 % des Biofilmvolumens) mit einem hohen Grad an Organisation. Eingebettet in einer von den Organismen selbst produzierten polymeren Matrix (EPS-Matrix; ca. 75 – 80 % des Biofilmvolumens), können Biofilme an eine inerte oder lebende Oberfläche adhären (Costerton et al. 1987; Costerton et al. 1995; Stoodley et al. 2002). Das Vermögen von Bakterien an Oberflächen zu adhären stellt den ersten essentiellen Schritt in der Bildung eines bakteriellen Biofilms dar und ist für viele Bakterien einer der wichtigsten Virulenzeigenschaften. Im Biofilm organisierte Bakterien agieren wie ein multizellulärer Organismus, wodurch ihnen vor allem in den Bereichen der Reproduktion, des Metabolismus bis hin zur Verteidigung gegenüber Bakterien oder wirtsspezifischen Abwehrmechanismen Selektionsvorteile gegenüber ihren planktonisch lebenden Spezies entstehen (Roberts et al.

1999; Wingender et al. 1999; Flemming et al. 2007; Flemming und Wingender 2010). Neben mechanischer Stabilität bieten Biofilme vor allem Schutz vor diversen Bedrohungen wie z. B. Strömungen, Austrocknung und UV-Strahlung, aber auch pH-Schwankungen der Umgebung sowie Schutz vor toxischen Substanzen, Bakteriophagen und Abwehrmechanismen des Wirtsorganismus (Costerton et al. 1987; Flemming et al. 2016). Insbesondere die verringerte Anfälligkeit der Mikroorganismen im Biofilm gegenüber der wirtsspezifischen Abwehr sowie Antibiotika ist hervorzuheben (Duguid et al. 1992a, 1992b; Xu et al. 2000; Stewart 2002; Stewart und Costerton 2001). Das große Volumen eines Biofilms ist durch seine EPS-Matrix geprägt. Sie besteht zu großen Teilen aus Wasser sowie Exopolysacchariden, Glykoproteinen, Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren (Stoodley et al. 2002; Donlan und Costerton 2002). Als dynamisches System ist die EPS abhängig von den umgebenden Umweltbedingungen, den Bakterienspezies im Biofilm sowie der Nährstoffversorgung, sodass die Zusammensetzung und die damit verbundenen chemischen und physikalischen Eigenschaften variiert (Flemming und Wingender 2010). Der EPS-Matrix kommt eine wichtige Rolle in der Nährstoffbereitstellung zu, da zum einen fast alle Bakterien im Biofilm in der Lage sind, diese enzymatisch zu degradieren und zum anderen auch extrazelluläre Enzyme eingeschlossen werden, die den Spezies den Substratzugang erleichtern (McCann 2000). Auch die oben erwähnte mechanische Stabilität der Biofilmstrukturen ist auf die Ausprägung der EPS zurückzuführen.

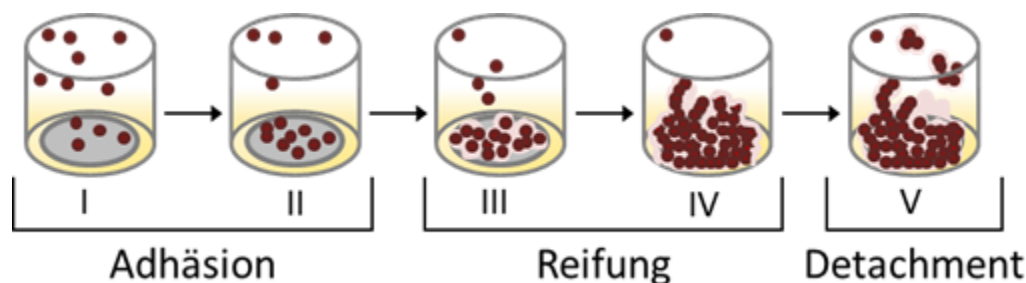


Abbildung 1: Schematische Darstellung der aufeinanderfolgenden Phasen der Biofilmbildung *in vitro*.

I. initiale unspezifische Adhäsion an einen Probekörper; II. irreversible spezifische Adhäsion an einen Probekörper; III. Proliferation und Akkumulation des Biofilms mit initialer Produktion der EPS-Matrix; IV. Reifung und Mikrostrukturierung des Biofilms; V. Detachment einzelner Mikroorganismen und Mikrokolonien aus dem bestehenden Biofilm.

Die Biofilmbildung von *S. epidermidis* erfolgt in vier bis fünf unterschiedlich gut differenzierbaren charakteristischen Phasen (siehe Abbildung 1 und Abbildung 3). Der erste Schritt in der Besiedlung einer biotischen oder abiotischen Oberfläche ist die Adhäsion. Während des Implantationsprozesses, z. B. einer Endoprothese, kommt es zur Ablagerung von Plasma-Proteinen (z. B. Albumin), Proteinen der Extrazellulären Matrix (ECM) oder auch Koagulationsprodukten wie Thrombin oder Thrombozyten auf der Implantatoberfläche (Gristina 1987; Otto 2009; Sabaté Brescó et al. 2017).

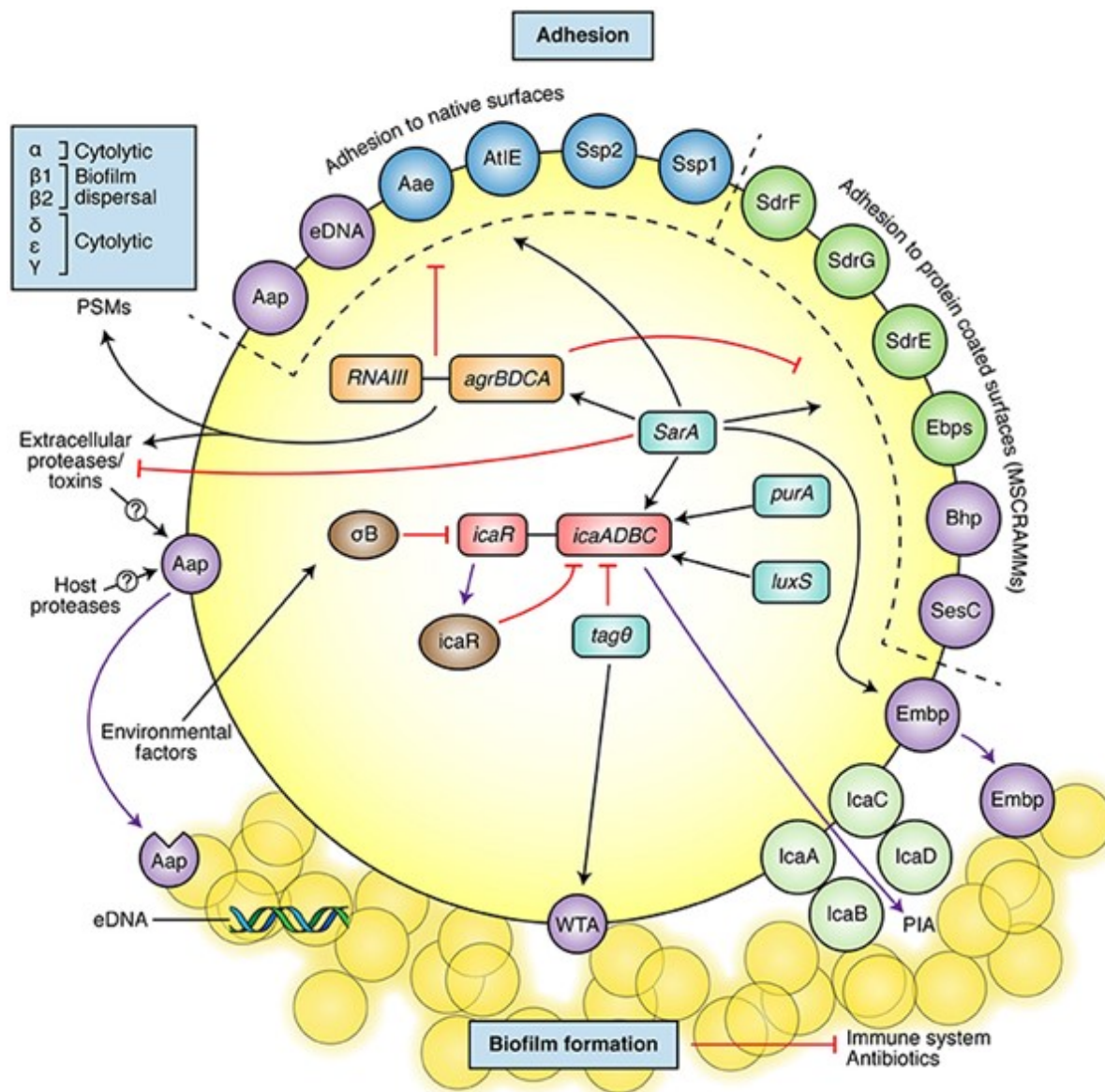


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Virulenzfaktoren (Adhäsionsmoleküle und Biofilmbildung) von *S. epidermidis*. In der oberen Bildhälfte sind die wichtigsten Moleküle zur Adhäsion an abiotische Oberflächen sowie Protein-beschichtete Oberflächen dargestellt. In der unteren Hälfte der Abbildung sind die wichtigsten Moleküle der Biofilmbildung dargestellt. Violett gekennzeichnete Moleküle sind sowohl in Adhäsions-, als auch Biofilmbildungs-Prozesse beteiligt (Sabaté Brescó et al. 2017).

Die initiale Adhäsion an eine Oberfläche durch *S. epidermidis* erfolgt zunächst unspezifisch durch z. B. hydrophobe Wechselwirkungen mit der zu besiedelnden Oberfläche (Gristina 1987). Abschließend kommt es zur spezifischen Adhäsion durch sogenannte Adhäsine (siehe Abbildung 2) wie Autolysin (AtlE), extrazelluläre DNA und Oberflächen Proteine der Staphylokokken (SSP-1, SSP-2) (Veenstra et al. 1996; Izano et al. 2008; Heilmann und Götz 2013). AtlE sowie SSP-1 und SSP-2 sind dabei vordergründig mit der Adhäsion an die native Oberfläche assoziiert, während extrazelluläre DNA die Anheftung an eine bereits bestehende Bakterien-Population auf der Oberfläche unterstützt. Zur direkten Bindung an eine

durch Blut-Proteine modifizierte Oberfläche dienen Zellwand-verankerte Proteine (CWA) wie z. B. sogenannte „microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules“ (MSCRAMMS) (Foster 1998; Otto 2009). Zu diesen MSCRAMMS zählen u. a. Adäsine zur spezifischen Bindung an Fibrinogen (SdrG/Fbe), Fibronectin (Embp), Kollagen (SdrF/GehD), Vitronectin (AtlE, Aae) oder auch Elastin (EbpS) (Hartford et al. 2001; Bowden et al. 2002; Arciola et al. 2003; Heilmann et al. 2003; Arrecubieta et al. 2007; Brennan et al. 2009; Sabaté Brescó et al. 2017). Aber auch Teichonsäuren der Peptidoglykanschicht verbessern die Adhäsion von *S. epidermidis* an Fibronectin und Fibrin (Hussain et al. 2001; Sabaté Brescó et al. 2017).

Nach der Adhäsion an die Zieloberfläche kommt es zur Proliferation sowie Zellwandprotein-vermittelten Aggregation einzelner *S. epidermidis* Bakterien. Sogenannte „Polysaccharide intercellular adhesins“ (PIAs oder PNAGs) vermitteln die Adhäsion einzelner *S. epidermidis* Bakterien untereinander (Mack et al. 2007; Sabaté Brescó et al. 2017). Zu den PIA-unabhängigen Mechanismen der Biofilmmakкумуляtion von *S. epidermidis* gehören u. a. „accumulation associated proteins“ (Aaps), „biofilm associated homolog proteins“ (Bhp), „extracellular matrix binding protein“ (Embp) sowie „*S. epidermidis* surface protein“ (Ses) (Williams et al. 2002; Bowden et al. 2005; Gill et al. 2005; Rohde et al. 2005; Tormo et al. 2005a; Christner et al. 2010; Los et al. 2010; Harris et al. 2016). Im Anschluss an die Aggregation und der Bildung von Mikrokolonien kommt es zur Bildung der EPS-Matrix durch oben genannte Proteine. Dieser Schritt führt u. a. zu einer internen Strukturierung des Biofilms. Derzeit existieren drei konzeptionelle Modelle, welche die Struktur von Biofilmen beschreiben (Wimpenny und Colasanti 1997): Biofilme mit heterogener Mosaikstruktur, dicht konfluente Biofilme sowie von Wasserkanälen durchzogene Biofilme. Letzteres Modell beschreibt die am häufigsten vorkommende Organisationsstruktur mikrobieller Biofilme (Stoodley et al. 2002). Die wassergefüllten Kanäle ermöglichen den raschen Stoffaustausch innerhalb des Biofilms, wodurch die einzelnen Mikrokolonien mit benötigten Nährstoffen versorgt werden. Gleichzeitig werden ihre Stoffwechselendprodukte in die Kanäle abgeleitet (Davey und O'Toole 2000; Dunne 2002).

Im Anschluss an den EPS-Sekretionsprozess kommt es zur Reifung des Biofilms und weiterer Proliferation und Aggregation von *S. epidermidis* Bakterien. Da das Dickenwachstum eines Biofilms begrenzt ist, kommt es zur Ausbreitung über das Ablösen, dem sogenannten „Detachment“, einzelner Bakterien oder auch Mikrokolonien aus dem reifen Biofilm (Costerton et al. 1999; Donlan und Costerton 2002). In *S. epidermidis* Biofilmen ist daran maßgeblich das Quorum-sensing System *agr* beteiligt (Vuong et al. 2003; Vuong et al. 2004a; Vuong et al. 2004b). Dabei steuert die *agr*-Expression in den äußeren, exponierten Schichten des Biofilms das Detachment. Zu den *agr*-regulierten Mechanismen des Detachments zählen die

enzymatische Degradation der EPS-Matrix sowie die Unterbrechung nicht-kovalenter Bindungen innerhalb der EPS-Matrix. Ersteres erfolgt über die Degradation von Zellwandproteinen durch unspezifische Exoproteasen, während Letzteres über PSMs dazu führt, dass Interaktionen zwischen kationischen PNAGs und anionische Zellwandproteinen aufgehoben werden (Otto 2009).

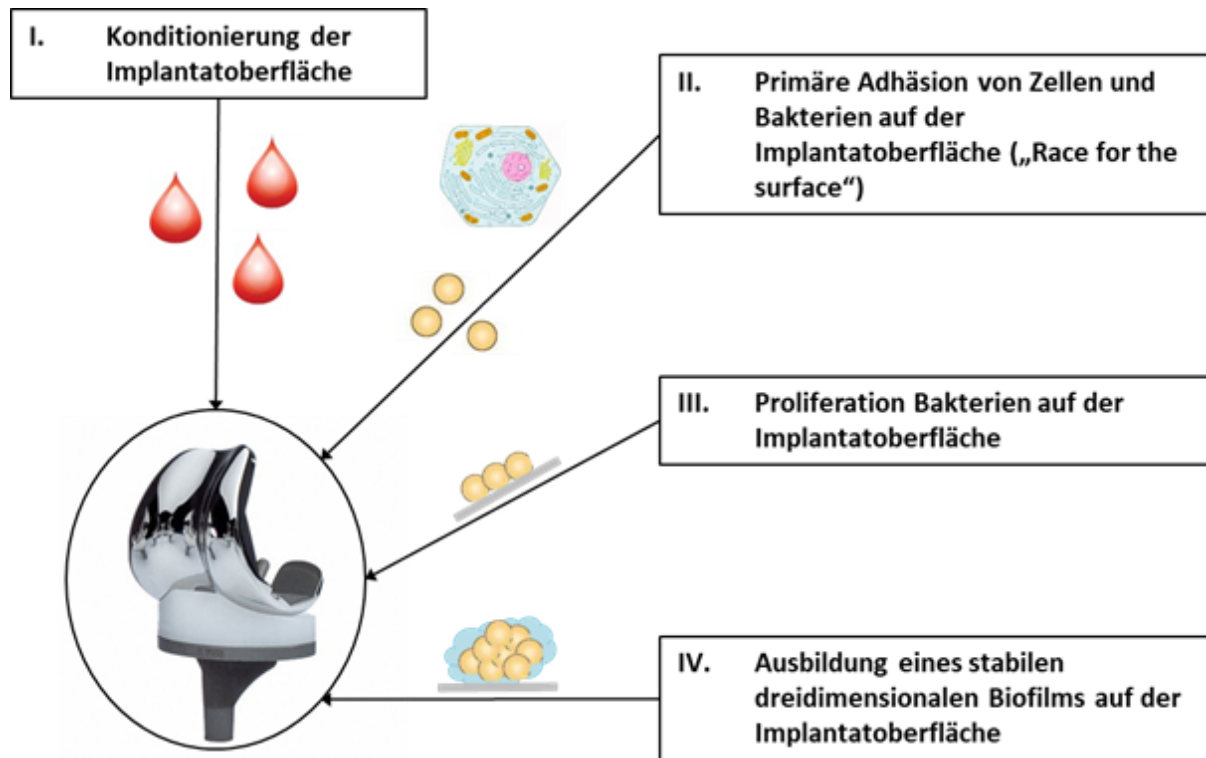


Abbildung 3: Schematische Darstellung der vier wichtigsten Phasen der Biofilmbildung am Beispiel einer Implantat-Infektion. Abbildung Knieendoprothese: Columbus© Knieendoprothesensystem Fa. Aesculap.

1.4 Antibiotikaresistenz von *S. epidermidis* Biofilmen

Im Vergleich zu planktonisch lebenden Bakterien weisen Biofilme eine 250 bis 1000-fach geringere Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika auf (Ceri et al. 1999; Wu et al. 2003). Ein Grund dafür liegt in den oftmals verringerten bakteriellen Stoffwechselaktivitäten (dormant stage) innerhalb eines Biofilms, sowie Subpopulationen, sogenannte „Persister cells“ mit stark erhöhter Resistenz gegenüber antibiotischen Substanzen (Hoyle und Costerton 1991; Costerton et al. 1995; Gilbert et al. 1997; Xu et al. 2000; Harrison et al. 2005). Bei unzureichender Behandlung der Biofilme mit entsprechenden Antibiotika-Konzentrationen sind diese Subpopulationen maßgeblich am erneuten Auftreten der Infektion beteiligt (Lewis 2007; Brady et al. 2009). Der Grund dafür liegt in der Adaption dieser persistierenden *S. epidermidis* an das Wachstum im Biofilm, sodass neben der Stoffwechselaktivität auch Prozesse wie Nukleinsäure-, Protein- und Zellwandsynthese herunter reguliert werden. Somit zeigen Antibiotika, die diese Mechanismen ausnutzen (z. B. Penicilline, Aminoglykoside oder

Quinolone), eine stark verminderte Aktivität gegenüber *S. epidermidis* innerhalb eines Biofilms. Aber auch die starken polymeren Quervernetzungen innerhalb der EPS-Matrix vermindern die Penetration antibiotischer Substanzen in tiefere Schichten des Biofilms (McCann 2000). Auf Grund der räumlichen Nähe der Bakterien innerhalb des Biofilms kommt es zu einem erleichterten Austausch von Resistenzgenen (Guo et al. 2018). *S. epidermidis* weist eine Vielzahl von spezifischen Resistenzgenen gegenüber antibiotischen Substanzen auf. Eine der am häufigsten auftretenden Resistenzen besteht gegenüber dem β -Laktam-Antibiotikum Methicillin (Diekema et al. 2001; Otto 2009; Morgenstern et al. 2016; Salgueiro et al. 2017). Die Resistenz gegenüber Methicillin und anderen β -Laktam-Antibiotika (z. B. Penicillin, Oxacillin) ist durch *mecA* auf dem „staphylococcal cassette chromosome“ *mec* (SCC*mec*), einem mobilen genetischen Element (MGE) kodiert. *MecA* ist ein alternatives Penicillin-bindendes Protein mit verringerter Affinität gegenüber β -Laktam-Antibiotika (Chambers et al. 1985). Methicillin-resistente *S. epidermidis* (MRSE) weisen häufig auch weitere Antibiotika-Resistenzen auf. Unter anderem gegenüber Erythromycin (kodiert auf dem *erm* Gen) und Ciprofloxacin, Clindamycin sowie Aminoglykosid-Antibiotika (kodiert auf dem *aacA/aphD* Gen) (Cherifi et al. 2013).

1.5 Physikalisches Plasma

Der Begriff physikalisches Plasma wurde 1928 vom Chemiker und Physiker Irving Langmuir geprägt und beschreibt den sogenannten vierten Aggregatzustand (Langmuir 1928). Physikalische Plasmen bestehen aus neutralen und geladenen Teilchen und entstehen, wenn Gasen elektrische oder Wärmeenergie zugeführt wird. In Folge dessen kommt es zu einer teilweisen oder vollständigen Ionisation der Teilchen innerhalb des Gases, wobei freie bewegliche Elektronen und ionisierte Atome entstehen (Misra et al. 2011; Lackmann und Bandow 2014). Neben mehreren angeregten Ladungsträgern wie Ionen und Elektronen bestehen Plasmen auch aus angeregten chemischen Spezies, wie reaktiven Sauerstoff (ROS)- und Stickstoff-Spezies (RNS). Weiterhin entstehen Wärme- und UV-Strahlung (UV-Photonen) sowie elektromagnetische Felder bei der Erzeugung physikalischer Plasmen (Zhang et al. 2013). Diese sind somit elektrisch leitfähig und weisen eine erhöhte Reaktivität auf (Metelmann et al. 2016). Als natürliche Zustände kommen physikalische Plasmen in Form von z. B. Blitzen oder Nordlichtern ubiquitär in der Umwelt vor. In der Nomenklatur von Plasmen werden diese üblicherweise abhängig von den Erzeugungsbedingungen in z. B. Nieder-, Atmosphären- oder Hochdruckplasmen unterteilt (Fridman et al. 2005). Aber auch die Differenzierung auf Grund ihres thermodynamischen Gleichgewichts in thermische (Gleichgewichtsplasmen) und nichtthermische (Nichtgleichgewichtsplasmen) Plasmen ist eine gängige Methode der Charakterisierung von physikalischen Plasmen (Scholtz et al. 2015). Nichtthermische Plasmen werden dabei weiterhin in heiße und kalte Plasmen unterschieden und

können unter Niederdruck oder Atmosphärendruck erzeugt werden. Nichtthermische Niederdruckplasmen kommen hauptsächlich in der Technik z. B. bei Beschichtungsprozessen zum Einsatz. Im Gegensatz dazu finden kalte Atmosphärendruckplasmen in der Medizintechnik ihre Anwendung. Abhängig von der Art der Plasmaquelle können kalte Plasmen direkt am Patienten eingesetzt werden, aber auch für die Sterilisation thermolabiler Materialien zum Einsatz kommen (Zhang et al. 2013). Plasmen sowie die erzeugenden Quellen können so entsprechend ihrer Anwendung angepasst werden. Kaltes Plasma kann durch verschiedene Methoden erzeugt werden, wie Gasentladung, Photo-Ionisation, Wärmestrahlung und Hochfrequenzen (Becker et al. 2005; Lieberman und Lichtenberg 2005). Gängige Einrichtungen zur Erzeugung kalter Plasmen nutzen Dielektrisch behinderte Entladungen (DBE), resistive Barriereentladung (RBE), Corona-Entladung, Glühentladung, Hochfrequenz-Entladung sowie Atmosphärendruckplasmajets (Ehlbeck et al. 2011). Für medizinische Anwendungen sind vor allem Plasmajet Anordnungen sowie DBEs besonders geeignet (siehe Abbildung 4) (Woedtke et al. 2013).

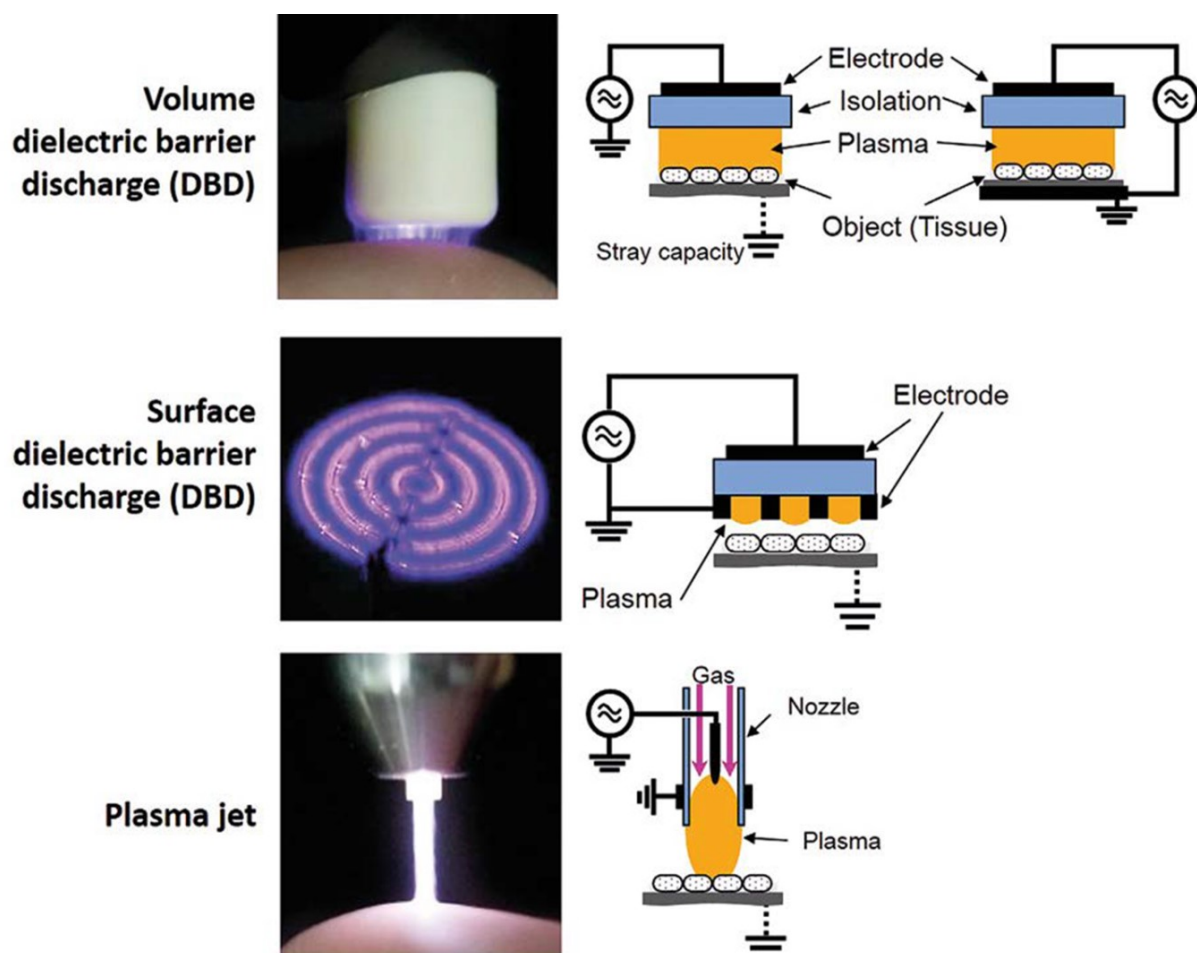


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Erzeugung kalter Plasmen. Dielektrische behinderte Entladung (DBE, volume discharge and surface discharge) und Plasmajet-Entladung (Plasma Jet) (Weltmann et al. 2016).

DBEs sind durch ihre direkte Entladung gekennzeichnet. Das Plasma wird dabei zwischen einer dielektrisch isolierten Elektrode (Dielektrikum) und einer biologischen Zielstruktur generiert, die als Gegenelektrode fungiert (z. B. Hautgewebe). Als Trägergas dient die Umgebungsluft. Somit interagieren die Plasmateilchen und angeregten Photonen direkt mit den biologischen Zielstrukturen. Das Dielektrikum verhindert elektrische Durchschläge und begrenzt dabei den maximalen Stromfluss (Lackmann und Bandow 2014; Metelmann et al. 2016). Indirekte Plasmen, die entfernt von der biologischen Zielstruktur generiert werden, können u. a. mit Hilfe von Plasmajets erzeugt werden. Als Arbeitsgase dienen bei indirekten Plasmen inerte Gase wie Argon oder Helium, welche durch eine Glaskapillare geleitet werden. Das Plasma wird innerhalb der Kapillare zwischen zwei Elektroden gezündet und über den Gasfluss und das elektrische Feld aus dieser herausgetrieben. Somit ist der Stromkreis in sich geschlossen und das Plasma wird unabhängig vom umgebenden Medium erzeugt. Reaktive Spezies und angeregte Photonen werden emittiert und bilden den sogenannten Effluenten. Bei indirekten Plasmen kommt es zu Rekombinationsprozessen innerhalb des Effluenten, sodass überwiegend langlebige reaktive Spezies die biologische Zielstruktur erreichen (Laroussi 2009; Lackmann und Bandow 2014; Metelmann et al. 2016). Plasmajets bieten eine indirekte Behandlung der Zielstruktur ohne thermische oder elektrische Einflüsse, was sie zu einem attraktiven Werkzeug plasmamedizinischer Anwendungen macht.

1.6 Antimikrobielle Eigenschaften kalter Atmosphärendruckplasmen

Die Entwicklung von kalten Atmosphärendruckplasmen eröffnete ein neues Feld der Anwendung von Plasmen – die Plasmamedizin. Die Anwendungsfelder reichen dabei von plasmabasierten Oberflächenmodifikationen, über die Inaktivierung von Mikroorganismen zur Hygiene und Infektionskontrolle, bis hin zur zielgerichteten Behandlung von eukaryotischen Zellen im Rahmen spezifischer Applikationen im Bereich der Dermatologie (Kong et al. 2009; Heinlin et al. 2010). Insbesondere der Einsatz von kalten Plasmen zur antimikrobiellen Behandlung von entzündlichen Hauterkrankungen und Wunden stellt einen vielsprechenden Einsatz in der Plasmamedizin dar (Daeschlein G. aus Metelmann et al. 2016). Aber auch andere infektiöse Erkrankungen stehen im Fokus der Plasmamedizin. Auf Grund der nachgewiesenen antimikrobiellen Eigenschaften von kalten Atmosphärendruckplasmen rücken diese immer mehr in den Fokus als alternativer Ansatz zur Infektionskontrolle. Im Vergleich zu den gebräuchlichen antimikrobiellen Methoden hat kaltes Plasma den Vorteil einer kurzen, direkten Behandlung der Infektion mit geringen Nebeneffekten (Mai-Prochnow et al. 2014). Die genauen Mechanismen, auf denen der antimikrobielle Effekt von kalten Plasmen beruht, sind bisher nur in Ansätzen aufgeklärt. Es wurde jedoch gezeigt, dass die Wirkung kalter Plasmen multifaktorieller Natur ist. Die Bildung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies wie Ozon, atomarer Sauerstoff, Singulett-Sauerstoff, Superoxid, Peroxid, Hydroxyl-

Radikale, aber auch atomarer Stickstoff, angeregter Stickstoff und Stickoxid spielen eine entscheidende Rolle während der Inaktivierung von Mikroorganismen (Joshi et al. 2011; Alkawareek et al. 2012). Auf Grund der Diffusion der reaktiven Spezies durch die Zellwand der Bakterien kommt es dort zu einer lokalen Schädigung durch Oxidation der Zellwandstrukturen, Proteine und intrazellulärer DNA (Gallagher et al. 2007). So wiesen Joshi und Kollegen nach, dass Singulett-Sauerstoff und Wasserstoffperoxid zu einer Peroxidation der Membranlipide sowie der DNA in *E. coli* führten (Joshi et al. 2011). Weiterhin wird die Effizienz der mikrobiellen Inaktivierung durch die Anwesenheit von ROS verstärkt, sodass eine Beimischung von Sauerstoff zum Arbeitsgas von Vorteil ist (Boxhammer et al. 2012). Sureshkumar und Kollegen wiesen durch die Beimischung von 2 % Sauerstoff zu Stickstoff die Bildung von Stickoxiden nach, wodurch die antimikrobielle Wirkung des Stickstoffs gefördert wurde (Sureshkumar et al. 2010). Die Exposition der bakteriellen Zellwand mit geladenen Partikeln, Elektronen und Ionen führt zu einem Aufbrechen chemischer Bindungen, wodurch es zu Degradation der Zellwand („Etching“) und Permeabilisierung der Zellmembranen kommt, sodass intrazelluläre Proteinen und DNA geschädigt werden (Gallagher et al. 2007; Moreau et al. 2008; Schneider et al. 2011; Winter et al. 2011; Lackmann et al. 2013; Winter et al. 2013). Die Inaktivierung gram-negativer Bakterien ist auf Grund der Anfälligkeit der Zellwand einfacher zu erreichen, als im Vergleich zu gram-positiven Bakterien (Stoffels et al. 2008). Die intrazelluläre Beschädigung von Bakterien wurde durch Anreicherung von ROS eher in gram-positiven Spezies nachgewiesen (Han et al. 2015). Eine weitere wichtige Rolle spielt die Applikation Plasmen. Direkte Plasma-Behandlungen mittels DBE führen zu einer Akkumulation geladener Partikel an der Zellwand der Bakterien und somit zu elektrostatischem Stress. Dadurch kommt es zu einer Änderung der Morphologie der Bakterien, indem die Zugspannung der Zellmembran überwunden wird (Mendis et al. 2000; Laroussi 2009; Lunov et al. 2016). Weiterhin kommt es durch elektrische Felder während der Plasma-Behandlung zur Elektroporation der Zellwand, wodurch es zur Permeabilisierung der Zellwand mit anschließendem Zelltod kommt (Sale und Hamilton 1967; Zimmermann et al. 1980; Liao et al. 2017). Neben der vollständigen Inaktivierung der Bakterien reagieren diese mit einem Zustand, in dem sie noch vital, aber nicht mehr nachweisbar sind (viable but not culturable, VBNC) (Abramzon et al. 2006; Cooper et al. 2010; Brelles-Mariño 2012). Für diesen Zustand werden vor allem initiale UV-Schäden und oxidativer Stress bei kurzen Expositionszeiten (≤ 5 min) diskutiert (Mai-Prochnow et al. 2014). Auch gegen bakterielle Biofilme erweisen sich kalte Plasmen als effektiv (Pei et al. 2012).

1.7 Zielstellung

Implantat-assoziierte Infektionen stellen trotz großer Fortschritte in der orthopädischen Chirurgie ein weiterhin weitreichendes Problem für den Patienten sowie die Gesundheitswirtschaft dar. Hervorgerufen werden diese Infektionen durch Biofilm-bildende Bakterien auf den Implantat-Oberflächen. Diese stellen auf Grund ihrer rauen Oberfläche ein ideales Reservoir für bakterielle Biofilme dar, in den die Bakterien u.a. gegenüber Antibiotika geschützt sind und Resistenzen entwickeln können. Im Jahr 2014 meldete die WHO einen dramatischen Anstieg der bakteriellen Resistenz weltweit. Damit verbunden sind hohe gesundheitliche und wirtschaftliche Belastungen. Auch in der Behandlung Implantat-assoziiierter Infektionen stellt die Entwicklung von Resistenzen gegenüber Antibiotika ein stetig wachsendes Problem dar (Spellberg et al. 2008; Nikaido 2009; Andersson und Hughes 2010). So bedarf es immer weiterer therapeutischer Optionen zur Inaktivierung und Entfernung bakterieller Biofilme auf orthopädischen Implantaten (Cos et al. 2010). Die antimikrobiellen Effekte von kalten Plasmen gegen eine Vielzahl von Bakterien, auch Antibiotika-resistente Spezies und Biofilme, sind in der Literatur zahlreich diskutiert (Hübner et al. 2010; Koban et al. 2010; Matthes et al. 2013). Die antimikrobielle Wirksamkeit von kalten Plasmen beruht dabei auf unterschiedlichen Komponenten, die innerhalb der Plasmen erzeugt werden. Dazu zählen u.a. reaktive Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies, freie Radikale, Ionen, elektrische Felder, aber auch UV-Strahlung. Die keimtötenden Effekte lassen sich dabei vorwiegend auf die direkte Permeabilisierung der Zellwand durch Oxidation sowie Schädigung intrazellulärer Proteine und der DNA auf Grund oxidativen Stresses zurückführen (Lerouge et al. 2000; Lackmann und Bandow 2014).

Die grundlegenden Ziele der vorliegenden Arbeit war die *in vitro* Untersuchung der Eignung von kalten Atmosphärendruckplasmen als Therapie-Ergänzung bei Implantat-assoziierten Infektionen.

1. Zunächst sollten dazu unterschiedliche Plasma-Quellen hinsichtlich ihres antimikrobiellen Potentials auf Biofilme von *S. epidermidis*, einem der Hauptauslöser Implantat-assoziiierter Infektionen, untersucht und miteinander verglichen werden. Weiterhin sollten in diesem Ansatz die *in vitro*-Behandlung der Biofilme sowie optimale Behandlungszeiten und Read-out Parameter getestet werden.
2. Im Anschluss an den Vergleich der Plasma-Quellen sollte eine Quelle gewählt werden, um deren antimikrobielles Potential auf Biofilme von *S. epidermidis* auf Ti4Al6V-Implantat-relevanten Probekörpern zu untersuchen. Dabei sollten die optimierten Behandlungszeiten sowie Read-out Parameter angewendet werden. Um eine potentiell ir-

reversible Beschädigung der Biofilme nach Plasma-Behandlung nachzuweisen, sollten diese erneut kultiviert (Revitalisierung) und auf ihre Vitalität untersucht werden.

3. Auf Grund gesteigerter Resistenzen gegenüber Antibiotika innerhalb eines Biofilms sowie die bekannte Oxidation von bakteriellen Zellwänden durch kaltes Atmosphärendruckplasma, sollten Biofilme von *S. epidermidis* vor und nach Plasma-Behandlung auf eine potentiell gesteigerte Sensitivität gegenüber Antibiotika untersucht werden. Mögliche irreversible Beschädigungen der Biofilme sollten auch hier durch eine erneute Kultivierung nachgewiesen werden.
4. An Hand der multifaktoriellen Wirkung von kalten Atmosphärendruckplasmen wird angenommen, dass eine Resistenzentwicklung gegenüber diesen unwahrscheinlich ist. Aus der Literatur geht allerdings hervor, dass eine Plasma-Behandlung über einen kurzen Zeitraum zum Auftreten einer kleinen Anzahl von überlebenden Bakterien führen kann, die eine erhöhte Resistenz gegenüber Plasmaexposition aufweisen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese Bakterien einen höheren Grad an Resistenz gegenüber Wasserstoffperoxid vorweisen. Auch in der vorliegenden Arbeit sollte diese Option der Entwicklung einer Desensibilisierung gegenüber kalten Plasmen und auch reaktiven Sauerstoff-Spezies untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Antibiotika

In Tabelle 1 sind alle verwendeten Chemikalien, Enzyme, Antibiotika sowie Kits mit Angaben zu den Herstellern zusammengefasst.

Tabelle 1: Chemikalien, Enzyme, Antibiotika und Kits

Chemikalien/Enzyme/Antibiotika	Hersteller
Agar (Agar technical No.3)	Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK
Agarose (peqGOLD Universal Agarose)	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Columbia Blutagarplatten	BD, Franklin Lakes, USA
Dikaliumhydrogenphosphat x 3 H ₂ O	Carl-Roth GmbH & Co., Karlsruhe, D
Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt, D
DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen, Hilden, D
dNTPs	Roche, Mannheim, D
Ethanol (absolut)	Zentralapotheke Universitätsmedizin, Rostock, D
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
E-Test Ampicillin 0.016-256 µg/ml	bioMérieux SA, Marcy'l'Etoile, F
E-Test Erythromycin 0.016-256 µg/ml	bioMérieux SA, Marcy'l'Etoile, F
E-Test Gentamicin 0.016-256 µg/ml	bioMérieux SA, Marcy'l'Etoile, F
E-Test Levofloxacin 0.002-32 µg/ml	bioMérieux SA, Marcy'l'Etoile, F
Erythromycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Extran MA01	Merck KGaA, Darmstadt, D
GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
Gentamicinsulfat 50 mg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Glutardialdehyd-Lösung (25 %)	Merck KGaA, Darmstadt, D

Chemikalien/Enzyme/Antibiotika	Hersteller
Glycerin (99 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, D
Kaliumacetat	Merck KGaA, Darmstadt, D
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, D
Kristall-Violett	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Levofloxacin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
<i>Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D
Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Methanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt D
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Natriumchlorid	Carl-Roth GmbH & Co., Karlsruhe, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg, D
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt, D
Paraformaldehyd (37 %)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Penicillin	Ratiopharm GmbH, Ulm, D
Phosphorsäure	Merck KGaA, Darmstadt, D
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, D
Safranin	Merck KGaA, Darmstadt, D
Secusept	Ecolab Deutschland GmbH, Monheim am Rhein, D
<i>Taq</i> -Polymerase	Qiagen, Hilden, D
Tris (Trizma® Base)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

Chemikalien/Enzyme/Antibiotika	Hersteller
Tryptic Soy Broth (TSB)	Applichem GmbH, Darmstadt, D
Tween 80	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Vancomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 2 sind alle verwendeten Verbrauchsmaterialien sowie deren Hersteller aufgeführt.

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Chamber-Slides <i>LabTec Chambers</i>	Nunc, Wiesbaden, D
CryoTube™ Vials	Nunc™ A/S, Roskilde, DK
Deckgläschen (Plastik; Durchmesser 13 mm)	Nunc, Wiesbaden
Desinfektionsmittel AHD2000	Lysoform Dr. Hans Rosemann GmbH, Berlin, D
Desinfektionsmittel Bacillol®	AF Bode Chemie, Hamburg, D
Glasperlen (0,10-0,11 mm)	B. Braun Biotech international, Melsungen, D
Glasperlen (2,85-3,3 mm)	Carl-Roth GmbH + Co., Karlsruhe, D
Impfösen	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Küvetten (10 x 4 x 45 mm)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
PCR Softtubes 0,2 ml	Biozym, Hessisch Oldendorf, D
Petrischalen (92 x 16 mm)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen 10 µl graduiert	STARLAB GmbH, Ahrensburg, D
Pipettenspitzen (200, 1000 µl)	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Plastikpipetten (5, 10, 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Plastikröhrchen Cellstar® Tubes (15, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Stepper-Spitzen Combitips plus® (5; 10; 20 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Sterifix® Injektionsfilter (0,2 µm)	BB. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Sterilfilter (0,22 µm)	Corning incorporated, Kaiserslautern, D
Spritzen, steril BD Discardit™ II (2, 5, 20 ml)	Becton Dickinson S.A., Fraga, Spanien
UVpetteTips für Picodrop Nr. 311.110	Biozym, Hessisch Oldendorf, D
Zellkulturplatten, 96 und 24 Well-Format	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich

2.1.3 Laborgeräteausstattung und Software

Die folgenden Tabelle 3 und

Tabelle 4 fassen alle Geräte und Software sowie deren Hersteller bzw. Entwickler zusammen, die zusätzlich zur Laborgrundausrüstung genutzt wurden.

Tabelle 3: Laborgeräte

Laborgeräte	Hersteller
Agarose-Gelelektrophoreseapparatur	Bio-Rad-Laboratories, Hercules, USA
Analysenwaage Typ Adventurer™ Pro	Ohaus Corporation, Pine Brook, USA
Analysenwaage Typ BP 4100S	Sartorius, Göttingen, D
Biofuge pico	Heraeus, Hamburg, D
Biofuge fresco	Heraeus, Hamburg, D
Brutschrank Typ B6060	Heraeus, Hamburg, D
Brutschrank, HeraCell	Heraeus, Hamburg, D
CO ₂ -Inkubator Serie CB	Binder, Tuttlingen, D
Eddy Jet Spiralplater 1.22	IUL Instruments GmbH, Königswinter, D

Laborgeräte	Hersteller
Feldemissionsrasterelektronenmikroskop Merlin VP compact	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D
Fluoreszenzmikroskop BX60	Olympus, Hamburg, D
Gefrierschrank -80 °C Typ Hera freeze	Heraeus, Hamburg, D
Heizblock Typ Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg, D
Konfokales Laser Raster Mikroskop – Zeiss LSM 780	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D
Kühlzentrifuge Typ 5417R g	Eppendorf, Hamburg, D
Kritisch Punkt Trockner	Emitech, Ashford, UK
Lyophilisator Alpha 1-4	Christ Laborgeräte, Osterode
pH-Meter inoLab pH 720	WTW GmbH, Weilheim, D
pH-Meter MP220	Denver Instrument GmbH, Göttingen, D
Picodrop Microlitre Spectrophotometer	Bio-Rad-Laboratories, Hercules, USA
Pipetten (10; 20; 100; 200; 1000 µl)	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Pipettierhilfe accu jet®	pro Brand GmbH & Co KG, Wertheim, D
Reinstwasseranlage „Ultra Clear plus“	Systemische Gesellschaft, Berlin, D
Ribolyser	Hybaid, Teddington, UK
Spektrophotometer SpectraMax M2	Molecular Devices, Ismaning, D
Stepper „Multipette plus“	Eppendorf, Hamburg, D
Sterilbank Typ Herasafe	Thermo Scientific, Waltham, USA
Tpersonal Thermocycler	Biometra, Göttingen, D
Thermoblock PCR T3	Biometra, Göttingen, D
Vortex-Genie Touch Mixer	Scientific Industries, Bohemia, USA
Vortex-Schüttler	VWR, Darmstadt, D
Zentrifuge Varifuge 3.OR	Heraeus, Hamburg, D

Tabelle 4: Software

Software	Entwickler
GraphPad Prism 6.01	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
Image J Fiji	National Institute of Health, Bethesda, USA
Microsoft Office Edition 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Picodrop μ l Spektrophotometer-Software Version 1.03	Picodrop Ltd., SaffronWalden, UK
SpectraMax-Software SoftMax® Pro 5.4	MDS Analytical Technologies (US) Inc., Sunnyvale, USA
Windows 7	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Zeiss Zen Imaging Software	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D

2.2 Plasma-Quellen

Zunächst wurden fünf unterschiedliche Plasma-Quellen hinsichtlich ihres antimikrobiellen Potentials miteinander verglichen. Die Plasma-Quellen sowie die genutzten Gase wurden dabei vom Leibnitz-Institut für Plasmaforschung und Technologie Greifswald (INP, Greifswald, D) bereitgestellt. Alle Plasma-Behandlungen wurden unter Betreuung fachkundiger Mitarbeiter am INP Greifswald in Laboren mit S2-Sicherheitsstufe und Ozon-Warteinrichtungen sowie unter spezieller Belüftung durchgeführt. Folgende Plasma-Quellen wurden zunächst miteinander verglichen: kHz-Jet, kINPen08, kINPen09 und kINPen® MED (entwickelt vom INP, Greifswald) sowie eine Plasma-Quelle mit dielektrisch behinderter Entladung (DBD, Cinogy, Duderstadt, D). Die kINPen Plasma-Quellen (siehe Abbildung 5) bestehen aus einer inneren Elektrode, die von einer dielektrischen Kapillare und einer geerdeten Ring-Elektrode umgeben ist (Weltmann et al. 2009; Woedtke et al. 2013). Durch die Kapillare werden im Fall der vorliegenden Arbeit Argon und molekularer Sauerstoff dem zündenden Plasma zugeführt und eine Hochfrequenzspannung an die innere Elektrode angelegt.

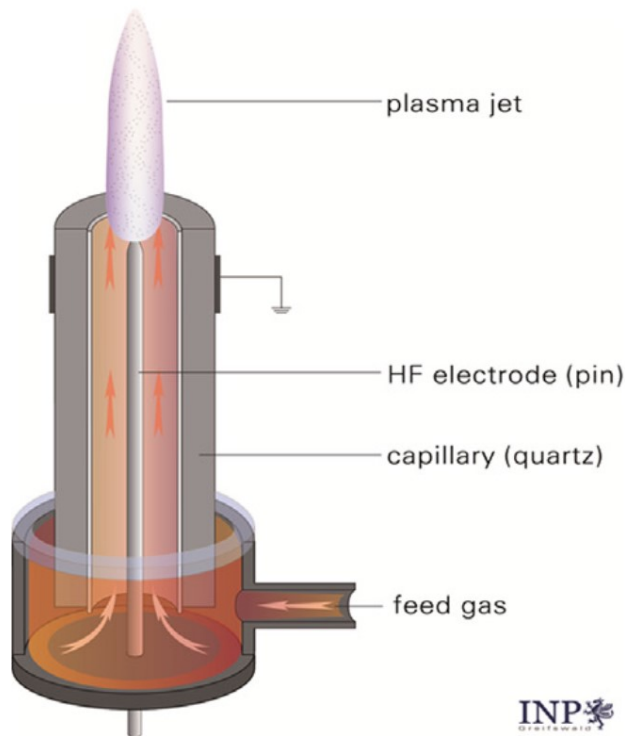


Abbildung 5: Schematische Darstellung einer kINPen Plasma-Quelle. Die Plasma-Quelle besteht aus einer inneren Elektrode (HF electrode) und einer dielektrischen Kapillare (capillary) (Mann et al. 2016).

Der kHz-Jet besteht aus einer Injektionsnadel (innerer Durchmesser 1,5 mm; äußerer Durchmesser 2,0 mm), durch die das Argon-Sauerstoff-Gemisch den Plasma-Jet speist. An die Injektionsnadel wird eine sinusförmige Spannung angelegt, als Gegenelektrode dient das Substrat, auf das das Plasma dann appliziert wird. Bei der DBD wird die Elektrode durch eine dielektrische Oberfläche abgedeckt und wie beim kHz-Jet dient das Substrat als Gegenelektrode. Eine sinusförmige Spannung entzündet auch hier das Plasma zwischen der dielektrischen Oberfläche und der Gegenelektrode. Als Träger-Gas fungiert hier die Umgebungsluft.

Tabelle 5: Charakteristische Parameter der verwendeten Plasma-Quellen. Mit (*) markierte Parameter stellen den Betrieb der Plasma-Quelle im „Burst“-Modus dar. Für den kINPenMed wurde eine „Burst“-Wiederholungs-Frequenz von 2,5 kHz, für die DBD eine Frequenz von 200 bis 300 Hz voreingestellt. Der Messwert der Leistung wurde abhängig vom Probenabstand ermittelt (Duske et al. 2015b).

Plasma-Quelle	Frequenz	Spannung [kVpp]	Gasfluss (Ar)	Gasfluss (O ₂)	Probenabstand [mm]	Leistung [mW]
kINPen08	1.5 MHz	1-5	5 slm	50 sccm	4-5	950
kINPen09	1.1 MHz	2-6	5 slm	50 sccm	4-5	350
kINPenMED	1.1 MHz*	2-6	5 slm	50 sccm	4-5	220

Plasma-Quelle	Frequenz	Spannung [kVpp]	Gasfluss (Ar)	Gasfluss (O ₂)	Probenabstand [mm]	Leistung [mW]
kHz-Jet	22 kHz	4-8.5	4 slm	40 sccm	1-2	100
DBD	100 kHz*	~13	-	-	1-2	-

Wie von Weltmann et al 2009. beschrieben, wurde die Leistung der kINPen Quellen und des kHz-Jet an der Distanz zwischen Substrat und Plasma-Jet kalorimetrisch an einer Kupfer Unterlage mit angeschlossener Glasfaser-Temperatur-Sonde aufgezeichnet (Weltmann et al. 2009). Die gemessenen Leistungswerte sind in Tabelle 5 dargestellt. Die Leistung der DBD lag unterhalb der Detektionsgrenze und wurde daher nicht gemessen. Ein weiterer Unterschied zwischen den unterschiedlichen Quellen lag in der Art und Weise wie das Plasma entzündet wird sowie in der Plasma-Entladung. Die kINPen-Quellen zünden das Plasma innerhalb einer Kapillare durch eine dielektrisch behinderte Entladung des Argon-Sauerstoff-Gemischs, sodass das Plasma kontinuierlich aus der Quelle auf das Substrat über die umgebende Luft entladen wird (Iseni et al. 2014). Durch Änderung elektrischer Parameter (z. B. Frequenz, Einschaltdauer und Spannungsamplitude) ist es möglich, die unterschiedlichen Quellen permanent an die jeweilige gewünschte Applikation anzupassen. Der kHz-Jet hingegen zündet ein anderes Plasma als die kINPen-Quellen, mittels sogenannter transient gezündeter Entladung von Argon (Gerling et al. 2013). Während das kontinuierlich gezündete Plasma der kINPen-Quellen durch Ableitströme im Bereich von $I=10$ mA über einen Zeitraum von 100 ns charakterisiert ist, sind für kHz-Jet über einen Zeitraum von nur 10 ns Ableitströme im Bereich von $I=1$ A nachgewiesen. Daraus geht hervor, dass für beide Quellen-Typen unterschiedliche Mechanismen der Entladung zu Grunde liegen. Ein anderes Prinzip nutzt die DBD, welche kontinuierlich Plasma über die umgebende Luft entzündet (statistisch verteilt über die dielektrische Oberfläche). Außer der DBD benutzen alle Quellen einen aktiven Gasfluss (Argon + Sauerstoff) als Arbeitsgas. Unterschiede im Gasfluss und deren Einfluss auf bakterielle Biofilme wurden in der vorliegenden Arbeit vernachlässigt, da davon auszugehen ist, dass sowohl die kINPen-Quellen, als auch der kHz-Jet mit einer Gasfluss-Rate von 5 slm betrieben wurden. Weiterhin konnte durch Ermolaeva et al. 2011 gezeigt werden, dass unterschiedliche Gasfluss-Raten keinen Einfluss auf die Vitalität bakterieller Biofilme haben (Ermolaeva et al. 2011).

2.3 Bakterienstämme

In der nachfolgenden Tabelle 6 ist der verwendete Bakterienstamm *S. epidermidis* RP62A sowie seine Modifikationen mit entsprechender Kurzcharakteristik sowie Herkunft zusammengestellt.

Tabelle 6: Verwendete Bakterienstämme

Stammbezeichnung	Kurzcharakteristik	Referenz
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (RP62A; Winslow & Winslow) Evans	Fakultativ anaerobe, gram-positive, koagulase-negative, Kokken	Wildtyp-Stamm; Katheter Sepsis, Tennessee; ATCC 35984
<i>Staphylococcus epidermidis</i> RP62A + Plasma 1 min	Fakultativ anaerobe, gram-positive, koagulase-negative, Kokken	Exposition kaltes Atmosphärendruckplasma (kINPen08, 5 slm Argon, 1 % O ₂), 1 min, 1x PBS
<i>Staphylococcus epidermidis</i> RP62A + Plasma 3 min	Fakultativ anaerobe, gram-positive, koagulase-negative, Kokken	Exposition kaltes Atmosphärendruckplasma (kINPen08, 5 slm Argon, 1 % O ₂), 3 min, 1x PBS
<i>Staphylococcus epidermidis</i> RP62A + Gas 1 min	Fakultativ anaerobe, gram-positive, koagulase-negative, Kokken	Exposition Argon-Sauerstoff-Gasgemisch (kINPen08, 5 slm Argon, 1 % O ₂), 1 min, 1x PBS
<i>Staphylococcus epidermidis</i> RP62A + Gas 3 min	Fakultativ anaerobe, gram-positive, koagulase-negative, Kokken	Exposition Argon-Sauerstoff-Gasgemisch (kINPen08, 5 slm Argon, 1 % O ₂), 3 min, 1x PBS

2.4 Kulturmedien, Puffer und Lösungen

Tabelle 7: Kulturmedien, Puffer und Lösungen

TSB-Medium (800 ml, pH=7,5)	
TSB	24.0 g
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i> 800 ml
10x PBS (phosphate buffered saline, 1 l, pH=7,4)	
NaCl	1,37 M
KCl	0,027 M
KH ₂ PO ₄	0,015 M
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,079 M

Alle Medien, Puffer und Lösungen wurden vor ihrer Verwendung bei 121 °C, 2 bar für 20 min autoklaviert. Hitzelabile Zusätze wie Gentamicin, Erythromycin und Ampicillin wurden nach Sterilfiltration ab einer Temperatur < 50 °C hinzugefügt. Zur Herstellung einer 1x PBS-Lösung wurde die 10x PBS-Lösung 1:10 in *Aqua dest.* verdünnt und anschließend autoklaviert.

2.5 Bakterien-Kultivierung und Stammhaltung

Die Kultivierung von *S. epidermidis* erfolgte in Tryptic-Soy-Broth Komplexmedium (TSB-Medium, Applichem GmbH, Darmstadt, D). Als Festmedium diente kommerziell erworbener Columbia Blutagar (COL, BD, Franklin Lakes, USA) sowie TSB-Agar. Zur Herstellung der Festmedien wurden 1,5 % Agar (w/v) dem Medium vor dem Autoklavieren hinzugefügt.

Zur längerfristigen Aufbewahrung der Bakterien-Stämme wurden diese in TSB-Medium bis zu ihrer stationären Wachstumsphase kultiviert (37 °C, 5 % CO₂) und anschließend zentrifugiert (10 min, 3500 rpm, RT). Das entstandene Pellett wurde dann in 90 % Medium und 10 % Glycerin (steril, 99%ig) resuspendiert und in CryoTube™ Vials (NUNC, DK) überführt. Die Lagerung der Bakterien-Stämme erfolgte bei -80 °C (Langzeitlagerung) bzw. bei -20 °C (kurze Lagerung). Zur Herstellung von Flüssigkulturen wurden kryokonservierte *S. epidermidis* Stämme in 20 ml TSB-Medium mit einer sterilen Impföse inokuliert und anschließend bei 37 °C, 5 % CO₂ bis zum Erreichen ihrer stationären Wachstumsphase kultiviert.

2.6 Biofilmbildung von *S. epidermidis* auf TiAlV-Oberflächen unter statischen Bedingungen

Zur Untersuchung der Biofilmbildung wurde *S. epidermidis* RP62A bis zum Erreichen seiner stationären Wachstumsphase in TSB-Medium bei 37 °C, 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien zentrifugiert (10 min, 3500 rpm, Raumtemperatur) und die erhaltenen Bakteriensedimente mit 1x PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation unter obigen Bedingungen, wurden die Sedimente in 1 ml 1x PBS resuspendiert und die Bakterien auf ihre zuvor experimentell ermittelte spezifische optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,35 (ca. 10⁸ KBE/ml) eingestellt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension schrittweise in TSB-Medium verdünnt, um eine Bakterienzahl von ca. 1x10³ KBE/ml zu erreichen. Als Modelloberflächen für die Biofilmbildung dienten Korund-gestrahlte (Aluminiumoxid Partikel, 500 -600 nm, 6 bar) Probekörper aus Ti6Al4V mit einem Durchmesser von 11 mm, einer Dicke von 1 mm und einer Rauheit von 20-28 µm (DOT GmbH, Rostock, D). Diese wurden zur Sterilisation bei 121 °C, 2 bar für 20 min autoklaviert und in 24-Well-Mikrotiter-Platten überführt. In diese wurde die Bakteriensuspension inokuliert und über einen Zeitraum von sieben Tagen bei 37 °C, 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Ein vollständiger Mediumwechsel mit frischem TSB-Medium erfolgte alle drei Tage.

Zur Untersuchung der unterschiedlichen Plasma-Quellen wurden die Biofilme auf sterilen TCPS-Deckgläsern von 13 mm Durchmesser (Nunc, Wiesbaden; D) für sieben Tage unter obigen Bedingungen in TSB-Medium kultiviert.

2.7 Charakterisierung von Biofilmen von *S. epidermidis* auf TiAlV-Oberflächen

2.7.1 Vitalitätsuntersuchung mittels Lebendkeimzahlbestimmung (LKZ)

Zur Untersuchung der Vitalität von *S. epidermidis* Bakterien wurden die Lebendkeimzahlen auf den TiAlV-Probekörpern kultivierten Biofilmen sowie den planktonischen Bakterien im Überstand quantifiziert. Dazu wurden die Überstände in 1,5 ml Eppendorf-Reagenzgefäßen gesammelt. Anschließend wurden die Probekörper mit 1x PBS gespült und die Spüllösung verworfen. Die Probekörper wurden dann in sterile Glas-Reagenzgläser (Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, A) mit 1 ml 1x PBS überführt und die Biofilme mit Hilfe eines Ultraschallbads (BactoSonic, Bandelin Electronic GmbH & Co. KG Berlin, D) für 4 min bei 35 kHz von den Probekörpern gelöst (modifiziert nach Holinka et al. 2011; Patenge et al. 2012). Die entstandene Bakteriensuspension wurde im Anschluss seriell in 1x PBS verdünnt und 100 µl der Verdünnungsstufen mittels Glasperlen auf TSB-Agarplatten ausplattiert. Nach Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂-Atmosphäre für mindestens 24 h wurde die Anzahl Ko-

loniebildender Einheiten (KBE/ml) pro Verdünnungsstufe bestimmt. Die Lebendkeimzahlen der Überstände der Biofilme wurden wie oben beschrieben mittels serieller Verdünnung in 1x PBS und Kultivierung auf TSB-Agarplatten quantifiziert.

2.7.2 Vitalitätsuntersuchung nach Lebend/tot-Färbung mittels Fluoreszenz-Mikroskopie

Zur qualitativen Darstellung der Verteilung lebender und toter *S. epidermidis* Bakterien innerhalb der Biofilmstrukturen auf TiAIV-Probekörpern wurden diese mit Hilfe des BacLight Live/Dead Bacterial Viability Kit (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D) angefärbt. Die hergestellte Färbelösung (1:1000 in 1x PBS) wurde zu den gewaschenen Biofilmstrukturen auf den TiAIV-Probekörpern gegeben, diese für 15 min im Dunkeln inkubiert und anschließend mit dem Fluoreszenzmikroskop Zeiss LSM 780 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D) bzw. Olympus BX60 (Olympus, Hamburg, D) analysiert. Das BacLight Live/Dead Bacterial Viability Kit (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D) ist ein kommerziell erhältliches Färbe-Kit zur Darstellung lebender und toter Bakterien. Der Farbstoff besteht aus zwei fluoreszierenden Komponenten (Syto 9, Propidium-Iodid), die Bakterien unterschiedlich penetrieren. Syto9 ist ein grün fluoreszierender, neutral geladener Farbstoff und bindet sowohl an die Nukleinsäuren lebender, als auch toter bzw. nicht mehr kultivierbarer Bakterien. Propidium-Iodid (PI) ist ein positiv geladener, rot fluoreszierender Farbstoff, der er auf Grund seiner Ladung nur beschädigte Zellwände passieren kann und somit an Nukleinsäuren toter Bakterien bindet. Dabei verdrängt er Syto9 von der DNA der toten Bakterien, sodass letztlich alle lebenden Bakterien grün fluoreszierend und alle toten Zellen rot fluoreszierend dargestellt werden. Beide Komponenten wurden 1:1 gemischt und 1:1000 in PBS verdünnt. Die gemischte Färbelösung wurde entweder direkt für die Lebend/Tot-Färbung der Bakterien innerhalb der Biofilme eingesetzt, oder zur längerfristigen Aufbewahrung wie die Einzelkomponenten bei -20 °C aufbewahrt. Nach Färbung der Biofilme wurden diese mit 3,7 % Formaldehyd-Lösung für mindestens eine Stunde fixiert. Zur längerfristigen Aufbewahrung der gefärbten und fixierten Biofilme wurden diese bei 4 °C in 24-Well-Mikrotiterplatten gelagert.

Mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie wurden die Biofilme auf den TiAIV-Probekörpern dargestellt. Konfokale Laser-Raster Mikroskope stellen eine besondere Form der Lichtmikroskope dar. Sie ermöglichen die drei-dimensionale Abbildung von Strukturen, indem sie optische Schnitte von der zu untersuchenden Probe anfertigen. Diese werden dann digital zu einem drei-dimensionalen Bildstapel zusammengefügt. Das Prinzip der konfokalen Laser Raster Mikroskope liegt in der konfokalen Anordnung einer Anregungs- und einer Detektionslochblende („Pinhole“). Das heißt, dass beide Lochblenden einen gemeinsamen Brennpunkt besitzen. Somit werden nur Objektbereiche, die sich in der Fokusebene des Objektivs befinden abgebildet. Die Verschiebung des Fokuspunktes in einer Ebene

(„scannen“) führt zur Aufnahme optischer Schnitte durch die Probe. In der vorliegenden Arbeit wurde das konfokale Laser-Raster-Mikroskop Zeiss LSM780 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D) mit einem Objektiv mit 20-facher Vergrößerung verwendet und mit der Software Zeiss Zen (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D) prozessiert. Die Anregung der Fluoreszenz-Farbstoffe erfolgte mit einem Argon-Laser bei 488 nm sowie mit einem Helium/Neon-Laser bei 594 nm. Weiterhin wurden die gefärbten Biofilme mit dem Fluoreszenzmikroskop BX60 (Olympus, Hamburg, D) unter Verwendung der Filter U-MWB (Ex 470-490, Em 520 nm) sowie U-MWG (Ex 510-550, Em 590 nm) visualisiert. Die Auswertung der Bilder erfolgte mittels der Software ImageJ Fiji (National Institute of Health, Bethesda, USA).

2.7.3 Quantifizierung der Biofilmmasse mittels Kristall-Violett-Färbung

Zur Quantifizierung der Biofilmmasse von *S. epidermidis* auf TiAlV-Probekörpern wurde eine bereits etablierte Kristall-Violett-Färbung angewendet (Shen et al. 2013). Kristall-Violett bindet dabei an die bakteriellen Oberflächen sowie an die EPS-Matrix der Biofilme, nicht aber an die TCPS-Oberfläche der Mikrotiter-Platten bzw. die TiAlV-Probekörper. Die Biofilme auf den Probekörpern wurden dazu mit 1x PBS gewaschen und anschließend für mindestens 20 min mit 0,1 % Kristall-Violett-Lösung gefärbt. Nach dreimaligem Waschen mit *Aqua dest.* wurde das gebundene Kristall-Violett aus den Biofilmstrukturen gelöst. Dazu wurden die Biofilme für 15 min mit 1 % SDS bei Raumtemperatur gespült, die Spüllösung in 96-Well-Mikrotiterplatten überführt und die anschließend Absorption im Spektrophotometer (SpectraMax M2, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) bei einer Wellenlänge von 570-590 nm gemessen. Als Leerwert diente die 1 % SDS-Lösung. Die Messwerte wurden in der darauffolgenden Berechnung auf die Größe der Oberfläche der Probekörper normiert.

2.7.4 Darstellung der Biofilm-Morphologie mittels Raster-Elektronenmikroskopie (REM)

Die Untersuchung der Biofilm-Morphologie erfolgte mit Hilfe der Raster-Elektronenmikroskopie am Elektronenmikroskopischen Zentrum der Universitätsmedizin Rostock (EMZ, Rostock, D). Im Vergleich zur Lichtmikroskopie bietet die Elektronenmikroskopie den entscheidenden Vorteil, dass ein höheres Auflösungsvermögen und eine größere Tiefenschärfe erzeugt werden kann. Dabei wird in einem evakuierten Zylinder über Glühemission aus einer Kathode ein Elektronenstrahl (Primärelektronenstrahl) durch ein elektrisches Feld bis zur Anode beschleunigt. Dieser Elektronenstrahl wird durch elektromagnetische Linsen auf einen Durchmesser von bis zu 3 nm verkleinert und auf einen Punkt auf der Probenoberfläche fokussiert. Über Ablenkspulen wird dann zeilenförmig die Probenoberfläche abgetastet. Die durch Wechselwirkungen mit dem Primärelektronenstrahl entstehenden Sekundärelektronen aus den Atomen der Probenoberfläche werden mit einem geeigneten Detektor aufgenommen und in eine Graustufeninformation umgewandelt. Dabei beeinflusst

die Oberflächenbeschaffenheit der Probe die Detektion der verschiedenen Signalstärken. Proben, die mit Hilfe der Raster-Elektronenmikroskopie untersucht werden, müssen vakuumstabil sein, d.h. frei von Wasser, Lösungsmitteln und anderen Stoffen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Biofilme auf TiAlV-Probekörpern zunächst mit 1x PBS gewaschen und anschließend für mindestens 24 h in REM-Fixierpuffer mit 2,5 % Glutardialdehyd bei 4 °C fixiert. Die fixierten Proben wurden dann im EMZ der Universitätsmedizin mit Natriumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7,4) gespült und in einer aufsteigenden Ethanolreihe (5 min 30 % Ethanol; 5 min 50 % Ethanol; 10 min 70 % Ethanol; 15 min 90 % Ethanol; 2x 10 min 100 % Ethanol) getrocknet. Anschließend wurden die Biofilme auf den Probekörpern einer „Kritisch Punkt-Trocknung“ (Emitech, Ashford, GB) nach Herstellerangaben unterzogen. Hierbei wurde das Ethanol in der Probe durch flüssiges CO₂ ausgetauscht und in der Probenkammer auf maximal 32 °C aufgeheizt. Dies wiederum führt zu einer Erhöhung des Drucks innerhalb der Probenkammer auf 72 bar. Der kritische Punkt war erreicht, wenn das flüssige CO₂ vom flüssigen in den gasförmigen Aggregatzustand überging. Die getrockneten Proben wurden dann mit einer 10 nm Schicht aus Gold bedampft (sogenanntes sputtern) und mit dem Elektronenmikroskop Merlin VP compact (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D) analysiert.

2.8 Plasmabehandlung von Biofilmen

Um die Wirkung von kaltem Atmosphärendruckplasma auf *S. epidermidis* Biofilme zu untersuchen wurden diese zunächst auf TCPS-Deckgläschen bzw. Ti6Al4V-Probekörpern über einen Zeitraum von sieben Tagen kultiviert (siehe 2.6). Anschließend wurden die Probekörper in neue sterile 24-Well-Mikrotiter-Platten überführt, mit 1x PBS überschichtet und für die Plasmabehandlung an das INP in Greifswald transportiert. Die Plasmabehandlung der Probekörper bzw. TCPS-Deckgläschen erfolgte in Petrischalen (Ø 35 mm, Nunc, Roskilde, DK), die für jede Plasmabehandlung mit frischem 1x PBS versehen wurden, um einen Austrocknungseffekt der Biofilme durch Plasma zu vermeiden. Alle unter Abschnitt 2.2 charakterisierten Plasma-Quellen wurden für die Behandlung zentral über den Probekörpern bzw. TCPS-Deckgläschen fixiert. Dafür wurden die kINPen Plasma-Quellen in einer Portalmaschine befestigt. Der kHz-Jet wurde mit Hilfe einer Stativstange und Klemmen über den Proben fixiert, während die DBD freihändig zentral über den Proben gehalten wurde. Die Plasma-Quellen vom Typ kINPen sowie der kHz-Jet wurden mit einem Gasflussrate von 5 slm und einem Gemisch aus Argon und 1 % molekularem Sauerstoff betrieben. Für die DBD wurde wie schon unter 2.2 beschrieben die umgebende Luft als Trägergas verwendet. In der Petrischale befestigte selbstklebende Kupferfolie (Breite ca. 20 mm, Stärke ca. 0,035 mm, Würth Elektronik, Niedernhall, D) diente für die DBD sowie den kHz-Jet als Gegenelektrode. Da die Plasma-Quellen an unterschiedlichen Behandlungstagen unterschiedliche Plasma-Jets erzeugten, wurden die Plasma-Quellen für die Plasma-Behandlung so über den Proben fixiert,

dass jedes Mal die Spitze des Plasma-Jets die Probekörper bzw. Deckgläschen berührte. Die Biofilme auf den Probekörpern bzw. Deckgläschen wurden für 1 min, 3 min oder 5 min mit den Plasma-Quellen behandelt (siehe Abbildung 6). Anschließend wurden Proben in neue sterile 24-Well-Mikrotiter-Platten überführt und 15 Mal mit 1x PBS gespült. Die Spüllösungen wurden in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen gesammelt, um diese im Labor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der Universitätsmedizin Rostock (IMIKRO, Rostock, D) weiter zu bearbeiten. Für den Transport wurden die gespülten Probekörper mit 1x PBS überschichtet, um Austrocknungseffekte auf dem Transportweg zu vermeiden. Als Kontrollen dienten Biofilme auf den Probekörpern bzw. TCPS-Deckgläschen, die nicht mit Plasma bzw. nur mit dem Gasgemisch aus Argon und 1 % Sauerstoff behandelt wurden. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden auch diese den Transportwegen ausgesetzt.

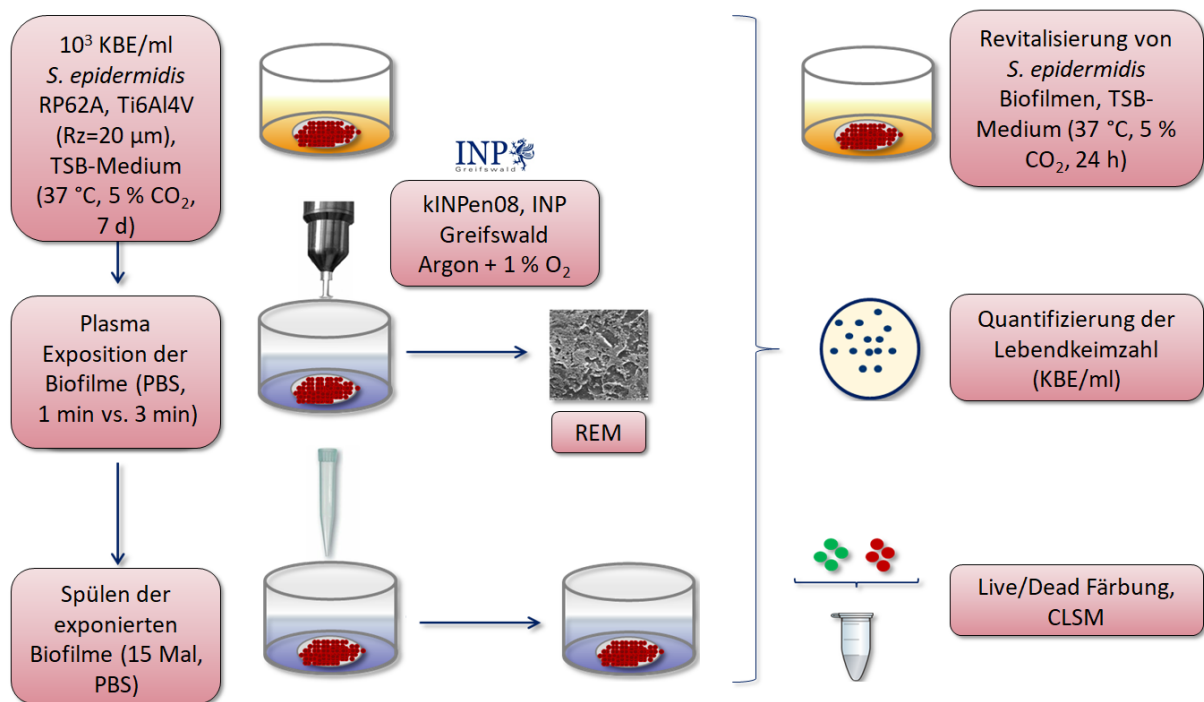


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Versuchsabläufe während der Plasma-Behandlung von Biofilmen von *S. epidermidis*.

Der Vergleich der unter 2.2 charakterisierten Plasma-Quellen erfolgte ausschließlich hinsichtlich ihres antimikrobiellen Potentials. Dazu wurden sowohl die gespülten Lösungen (planktonische Bakterien) sowie die Biofilme auf den Probekörpern bzw. TCPS-Deckgläschen nach der Plasma-Behandlung wie unter 2.7.1 beschrieben mittels Lebendkeimzahlbestimmung untersucht. Zur Bestimmung der Morphologie sowie der Verteilung lebender und toter Bakterien innerhalb der Plasma-behandelten Biofilme wurden diese wie unter 2.7.2 und 2.7.4 entsprechend gefärbt bzw. fixiert und getrocknet, um diese anschließend mit Hilfe der beiden Mikroskopie-Techniken zu untersuchen. Im Anschluss daran er-

folgte eine Auswahl der Plasma-Quelle mit dem größten antimikrobiellen Potential und der für diese Arbeit relevanten Behandlungszeiträume. Alle folgenden Versuche wurden mit dem kINPen08 und Behandlungszeiten von einer bzw. drei Minuten durchgeführt.

2.9 Untersuchung der Revitalisierung von *S. epidermidis* Biofilmen nach Plasma-Behandlung

Zur Untersuchung der längerfristigen Wirkung von Plasma auf die Biofilme von *S. epidermidis* RP62A wurden diese nach der Plasma-Behandlung für eine bzw. drei Minuten erneut kultiviert. Dazu wurden die Biofilme auf den Probekörpern nach der Plasma-Behandlung 15 Mal mit 1x PBS gespült und anschließend in eine neue 24-Well-Mikrotiter-Platte überführt. Nachfolgend wurden die Biofilme mit frischem TSB-Medium überschichtet und für weitere 24 h bei 37 °C, 5 % CO₂ kultiviert. Als Kontrollen dienten unbehandelte Biofilme sowie Biofilme, die nur dem Gasgemisch ausgesetzt waren. Im Anschluss daran wurde die Vitalität der Biofilme (siehe 2.7.1 und 2.7.2), die Biofilmmasse (siehe 2.7.3) sowie die Morphologie (siehe 2.7.4) dieser untersucht.

2.10 Wachstumskinetik von *S. epidermidis* nach Plasma-Behandlung der Biofilme

Um das Wachstumsverhalten von *S. epidermidis* nach Plasma-Behandlung der Biofilme auf den TiAlV-Probekörpern zu untersuchen, wurden diese zunächst wie unter 2.7.1 mittels Ultraschall-Behandlung von der Oberfläche der Probekörper gelöst. Anschließend wurden diese in frischem TSB-Medium 1:10 inokuliert und in Triplikaten in 96-Well-Mikrotiter-Platten überführt. Das Wachstum der so inokulierten Bakterien wurde dann über die Bestimmung der OD₆₀₀ im Spektrophotometer (Spectramax M2) über einen Zeitraum von 24 h bei 37 °C analysiert. Die optische Dichte wurde dabei stündlich ab dem Zeitpunkt der Inokulation gemessen. Als Leerwert diente steriles TSB-Medium. Das Wachstumsverhalten der unbehandelten bzw. mit dem Gasgemisch behandelten abgelösten Biofilme wurden als Referenz unter obigen Bedingungen analysiert. Die Zunahme der Extinktion über den Zeitraum von 24 h wurde halblogarithmisch mit Hilfe von GraphPad Prism dargestellt. Dabei entspricht der lineare Anstieg der Kurve der exponentiellen Wachstumsphase. Aus diesem Bereich wurde sowohl die Wachstumsrate (μ) als auch die Verdopplungszeit (t_d) bestimmt.

$$\mu = \log(x(t_2)) - \frac{\log(x(t_1))}{\log(e)} * (t_2 - t_1)$$

$$t_d = \ln(2) / \mu$$

μ	Wachstumsrate [1/h]
$x(t_1), x(t_2)$	Messwerte zu den Zeitpunkten t_1 und t_2
e	Eulersche Zahl (2,718281828459)
t_1, t_2	Zeitpunkte der Messung
\log	Logarithmus zur Basis 10
t_d	Verdopplungszeit [h]
\ln	Logarithmus zur Basis e (Logarithmus naturalis)

2.11 Untersuchung der Empfindlichkeit von *S. epidermidis* gegenüber ausgewählter Antibiotika nach Plasma-Behandlung

Um mögliche Antibiotikaresistenzen von *S. epidermidis* RP62A nachzuweisen, wurde zunächst in der Routinediagnostik des IMIKRO der Universitätsmedizin Rostock ein Antibio-gramm (VITEK® 2, bioMérieux, Nürtingen, D) von *S. epidermidis* RP62A angefertigt. In der nachfolgenden Tabelle sind die untersuchten Resistenzen sowie ausgewählt minimale Hemmkonzentrationen (MHK) aufgelistet.

Tabelle 8: Auszug Antibio-gramm *S. epidermidis* RP62A. Der Nachweis erfolgte mittels VITEK 2, es sind nur die Antibiotika und MHK dargestellt, für die eine Resistenz nachgewiesen wurde. Fettgedruckte Antibiotika wurden für weiterführende Versuche genutzt.

Antibiotikum	Interpretation
Oxacillin	Resistent, MHK ≥ 4
Ampicillin	Resistent
Cefuroxim	Resistent
Imipenem	Resistent
Gentamicin	Resistent, MHK = 4
Clindamycin	Resistent, MHK ≥ 8
Erythromycin	Resistent, MHK ≥ 8

2.11.1 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Ampicillin, Erythromycin und Gentamicin

Zur Bestimmung der MHK von Ampicillin, Erythromycin und Gentamicin wurden kommerziell erhältliche E-Test-Streifen verwendet (bioMérieux, Nürtingen, D). E-Test-Streifen sind gebrauchsfertige Kunststoffstreifen, die mit einem vorgefertigten, stabilen Gradienten (15 Konzentrationsstufen/Streifen) eines Antibiotikums beschichtet sind. Die Nutzung erfolgte nach Herstellerangabe. Dazu wurden zunächst wie unter 2.7.1 beschrieben, die Biofilme nach der Plasma-Behandlung sowie die Kontrollen mittels Ultraschall von den TiAlV-Probekörpern entfernt. Nach der Entnahme von jeweils 100 µl Bakteriensuspension für die LKZ-Bestimmung bzw. Wachstumskinetik, wurde die restliche Suspension für die Bestimmung der MHK genutzt. Zunächst wurde die OD₆₀₀ von allen behandelten Biofilmen nach Ultraschall ermittelt. Die Probe mit der geringsten optischen Dichte wurde dann zur Normierung der anderen Proben herangezogen, sodass diese entsprechend verdünnt wurden. Anschließend wurde mit Hilfe eines sterilen Wattestäbchen (Nerbe plus Germany, Winsen/Luhe, D) die Bakteriensuspension gleichmäßig auf einer TSB-Agar-Platte verteilt sowie mit einem E-Test-Streifen versehen. Diese wurden dann für 24 h bei 37 °C, 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Die MHK [µg/ml] wurde anschließend anhand eines Hemmhofs um den E-Test-Streifen herum entsprechend der Herstellerangaben bestimmt. In Abbildung 7 ist exemplarisch eine Agar-Platte mit E-Test-Streifen und entsprechendem Hemmhof dargestellt.

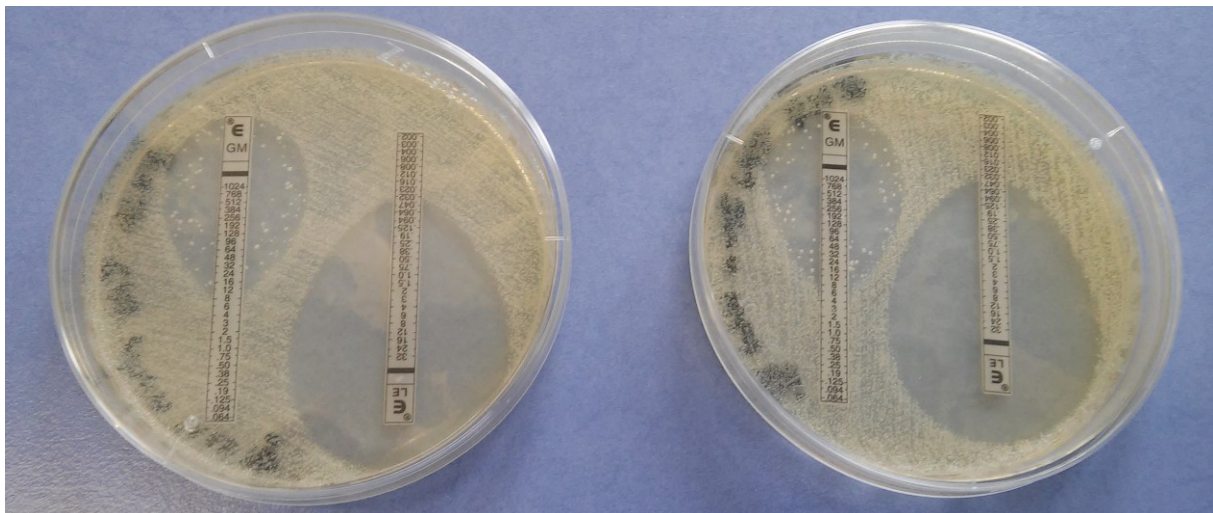


Abbildung 7: Exemplarische Darstellung der MHK-Bestimmung mittels E-Test. Anhand der Hemmhöfe um die E-Test-Streifen herum (Levofloxacin und Gentamicin) konnte die MHK [µg/ml] dieser Antibiotika bestimmt werden. Sobald der Hemmhof die MHK-Skala des E-Test-Streifen berührt, ist die Konzentration erreicht, die hemmend auf das Bakterienwachstum wirkt.

2.11.2 Untersuchung zur Empfindlichkeit des Biofilms von *S. epidermidis* in Anwesenheit von Gentamicin-Sulfat nach Plasma-Behandlung

Aus dem Antibiotogramm von *S. epidermidis* RP62A wird deutlich, dass für *S. epidermidis* RP62A eine Resistenz unter anderem gegenüber Gentamicin besteht. Auf Grund der bereits bekannten gesteigerten Unempfindlichkeit von Biofilmen gegenüber Antibiotika (Stewart und Costerton 2001), wurde in der vorliegenden Arbeit die Empfindlichkeit der Biofilme gegenüber Gentamicin-Sulfat nach Plasma-Behandlung untersucht. Gentamicin-Sulfat wurde dazu in einer Konzentration von 3,75 mg/ml in TSB-Medium gelöst. Die eingesetzte Konzentration entspricht der klinisch relevanten Dosis bei Patienten mit infizierten Hüftarthroplastien (Regis et al. 2013). Zur Untersuchung der Empfindlichkeit von Biofilmen gegenüber Gentamicin-Sulfat wurden diese zunächst wie unter 2.6 beschrieben auf Ti6Al4V-Oberflächen kultiviert. Nach der Plasma-Behandlung für eine bzw. drei Minuten (siehe 2.8) wurden die Biofilme mit 1x PBS 15 Mal gespült und mit Hilfe einer sterilen Pinzette in eine 24-Well-Mikrotiter-Platte überführt. Als Kontrollen dienten unbehandelte Biofilme sowie nur dem Gasgemisch exponierte Biofilme. Die Biofilme nach Plasma-Behandlung sowie die Kontrollen wurden dann mit TSB und Gentamicin-Sulfat (3,75 mg/ml) für weitere 24 h bei 37 °C, 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Im Anschluss wurde die Vitalität der Biofilme mittels Lebendkeimzahl und CLSM nach Lebend/Tot-Färbung sowie die Morphologie der Biofilme mittels REM untersucht. Mit Hilfe der Kristall-Violett-Färbung wurde weiterhin die Biofilmmasse quantifiziert.

2.11.3 Revitalisierung der Biofilme von *S. epidermidis* nach Plasma-Behandlung in Anwesenheit von Gentamicin-Sulfat

Um wie unter 2.9 beschrieben, die längerfristige Wirkung von Plasma und zusätzlicher Antibiose auf Biofilme von *S. epidermidis* zu untersuchen, wurden diese wie oben schon beschrieben erneut für 24 h bei 37 °C, 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Dazu wurden auch in diesem Versuch die Plasma-behandelten Biofilme 15 Mal mit 1x PBS gespült und in neue 24-Well-Mikrotiter-Platten überführt. Anschließend wurden die Biofilme für 24 h mit TSB-Medium und Gentamicin-Sulfat (3,75 mg/ml) unter obigen Bedingungen kultiviert. Die Biofilme wurden dann erneut 1 Mal mit 1x PBS gespült und für weitere 24 h mit TSB-Medium wie oben kultiviert. Im Anschluss daran wurden die Biofilme wie unter 2.9 beschrieben untersucht.

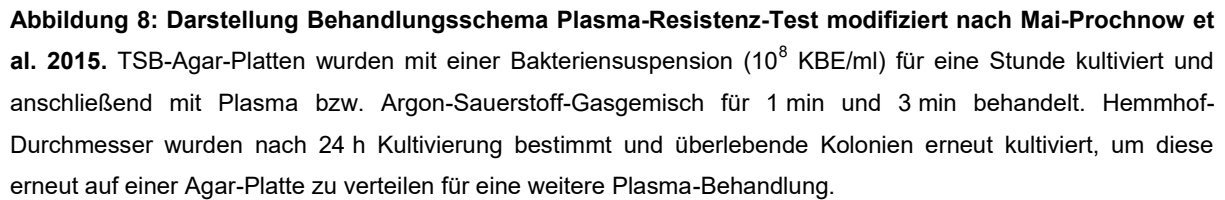
2.11.4 Untersuchung der Empfindlichkeit von *S. epidermidis* nach Plasma-Behandlung gegenüber ausgewählter Antibiotika im planktonischen Zustand

Wie aus dem Antibiotogramm ersichtlich, wurden für den verwendeten Stamm *S. epidermidis* RP62A diverse Antibiotika-Resistenzen festgestellt, u.a. gegenüber Ampicillin, Erythromycin und Gentamicin. Um die Empfindlichkeit von *S. epidermidis* RP62A gegenüber diesen im planktonischen Zustand nach Plasma-Behandlung zu untersuchen, wurden Wachstumski-

netiken mit unterschiedlichen Antibiotika-Konzentrationen aufgenommen. Die zunächst im Biofilm dem Plasma exponierten Bakterien wurden wie unter 2.7.1 beschrieben mittels Ultraschall von den TiAlV-Probekörpern abgelöst. Anschließend wurde die spezifische OD₆₀₀ von 0,35 in 1x PBS eingestellt. Die so eingestellten Bakterien wurden daraufhin 1:10 in TSB-Medium und unterschiedlichen Konzentrationen von Ampicillin, Erythromycin bzw. Gentamicin (1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml, 1000 µg/ml) verdünnt und in Triplikaten in 96-Well-Mikrotiter-Platten überführt. Im Anschluss daran wurden die Bakterien wie unter 2.10 beschrieben bei 37 °C im Spektrophotometer (Spectramax M2) kultiviert und stündlich die OD₆₀₀ bestimmt.

2.12 Untersuchung zur Resistenz von *S. epidermidis* RP62A gegenüber kaltem Atmosphärendruckplasma

Um eine mögliche Resistenz bzw. Unempfindlichkeit von *S. epidermidis* gegenüber kaltem Atmosphärendruckplasma zu untersuchen, wurde zunächst ein Agarplatten-basiertes Verfahren angewendet, bei dem Isolate aus einer Inhibitionszone nach einer ersten Plasmaexposition einer zweiten Plasma-Behandlung ausgesetzt wurden (siehe Abbildung 8). Dazu wurden 100 µl einer Bakteriensuspension mit einer Konzentration von 10⁸ KBE/ml mittels sterilem Wattetupfer auf einer TSB-Agar-Platte gleichmäßig verteilt und für 1 h bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend erfolgte die Plasma-Behandlung für 1 min bzw. 3 min mittig über der Agar-Platte. Der Abstand des Plasma-Jets zur Agar-Platte wurde so gewählt, dass dieser gerade so die Oberfläche der Agar-Platte berührte. Zusätzlich wurden zur Kontrolle Agar-Platten mit dem Argon-Sauerstoff-Gasgemisch behandelt. Die so behandelten Agar-Platten wurden dann für 24 h bei 37 °C, 5 % CO₂ kultiviert und anschließend entstandene Hemmhöfe mit Hilfe eines Lineals vermessen. Überlebende Kolonien aus dem Hemmhof-Bereich wurden dann in TSB-Medium für 24 h weiter kultiviert. Diese Übernachtskulturen wurden im Anschluss auf eine Konzentration von 10⁸ KBE/ml eingestellt und erneut in Triplikaten auf TSB-Agar verteilt. Diese wurden dann jeweils mit Plasma für 1 min bzw. 3 min sowie mit dem Gasgemisch wie oben beschrieben behandelt. Die Agar-Platten wurden anschließend für 24 h unter obigen Bedingungen kultiviert und erneut die Hemmhof-Durchmesser quantifiziert. Die verdünnten Bakteriensuspensionen der überlebenden Kolonien wurden dann auf ihre Sensitivität gegenüber Wasserstoffperoxid untersucht. Dazu wurden die Bakterien 1:10 in TSB-Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen Wasserstoffperoxid (1 %, 3 % und 10 %) verdünnt und in eine 96-Well-Mikrotiter-Platte überführt. Anschließend wurde die optische Dichte (OD₆₀₀) der Suspensionen über 24 h bei 37 °C im Spektrophotometer wie unter 2.10 beschrieben bestimmt. Als Kontrolle diente *S. epidermidis* aus einer frischen Vorkultur.



Statistische Analysen, wie das Berechnen von Mittelwerten und Standardabweichungen u.a., wurden mit Microsoft Excel 2010 und GraphPad Prism 6.01 vorgenommen. Alle Experimente wurden, wenn nicht anders vermerkt mit mindestens 4 biologischen Replikaten durchgeführt. Berechnungen hinsichtlich der Signifikanz erfolgten mit GraphPad Prism 6.01. Ein zweiseitiger Test (2way ANOVA) mit Dunnett Korrektur diente der Ermittlung der Signifikanzen (p-Wert), wobei p-Werte $\leq 0,05$ als signifikant, p-Werte $\leq 0,01$ als stark signifikant und p-Werte $\leq 0,001$ als höchst signifikant eingestuft wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Plasmabehandlung von Biofilmen

3.1.1 Antimikrobielles Potential verschiedener Plasma-Quellen

Zunächst wurde die antimikrobielle Wirksamkeit von kalten Plasmen unterschiedlicher Quellen auf Biofilme von *S. epidermidis* untersucht. In diesem ersten experimentellen Vergleich wurden Biofilme von *S. epidermidis* auf TCPS-Oberflächen für sieben Tage kultiviert. Die Plasma-Behandlung erfolgte am INP Greifswald mit dort bereits etablierten Quellen. Die Biofilme auf den TCPS-Oberflächen wurden jeweils für eine bzw. drei Minuten punktuell in 1x PBS mit den Plasmen behandelt. Um einen Wachschrift während operativer Eingriffe zu simulieren, wurden die Biofilme nach der Plasma-Behandlung 15 mal mit 1x PBS gespült. Anschließend erfolgte eine Quantifizierung der vitalen Bakterien innerhalb des Biofilms nach Plasma-Exposition.

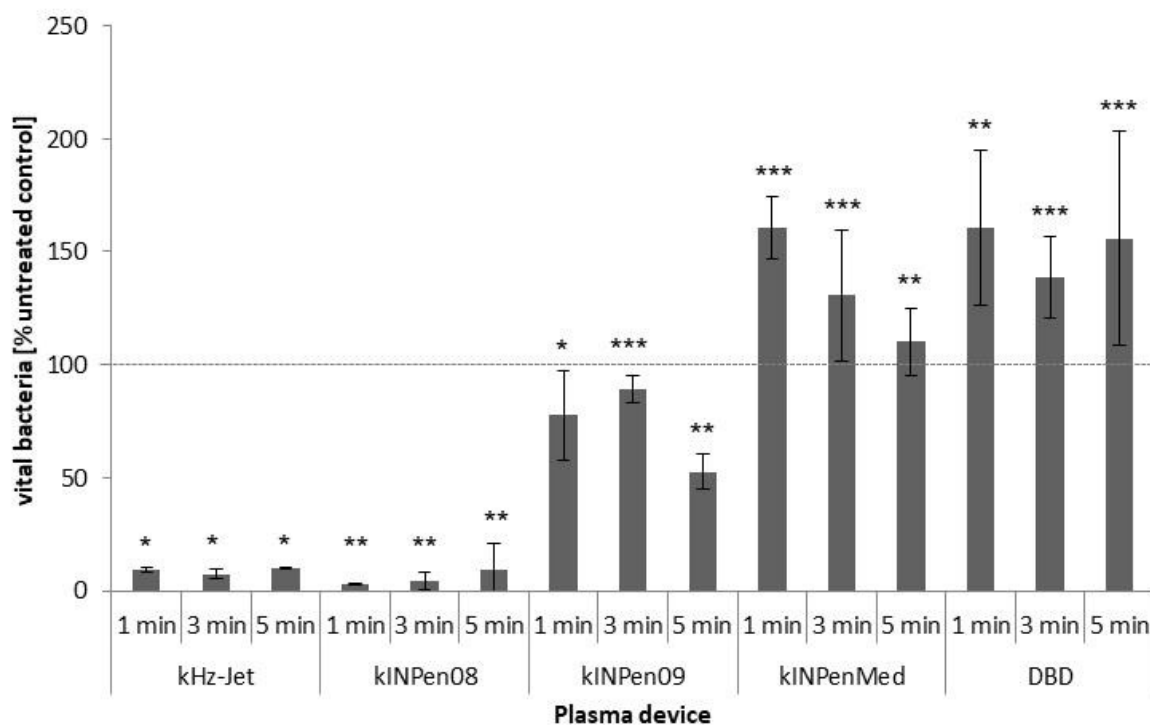


Abbildung 9: Darstellung der Lebendkeimzahlen (% zur unbehandelten Kontrolle \pm s.e.m.) von *S. epidermidis* im Biofilm (7 Tage, TCPS) nach einer, drei bzw. fünf Minuten Plasma-Exposition und Spülung mit 1x PBS. 2-Way ANOVA ($n \geq 3$), * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Aus (Duske et al. 2015b).

Wie in Abbildung 9 dargestellt, zeigt die Evaluierung der Lebendkeimzahlbestimmung eine signifikante Reduktion der Vitalität von *S. epidermidis* für den kHz-Jet um 90.84 % (s.e.m. \pm 0.9 %, $P < 0.05$) von $1,78 \cdot 10^7$ KBE/ml auf $4,7 \cdot 10^6$ KBE/ml. Für den kINPen08 konnte nach einer Minute Plasma-Exposition eine Reduktion der Lebendkeimzahl um 97.34 % (s.e.m. \pm 0.4 %, $P < 0.005$) von $1,78 \cdot 10^7$ KBE/ml auf $1,37 \cdot 10^6$ KBE/ml beobachtet werden. Nach drei

Minuten Plasma-Behandlung konnte eine weitere signifikante Reduktion der Lebendkeimzahl um jeweils eine Zehnerpotenz im Vergleich zur unbehandelten Referenzprobe durch den kHz-Jet (von $1,78 \cdot 10^7$ KBE/ml auf $3,8 \cdot 10^6$ KBE/ml) sowie den kINPen08 (von $1,78 \cdot 10^7$ KBE/ml auf $2,19 \cdot 10^6$ KBE/ml) erreicht werden. Für die verbliebenen getesteten Plasma-Quellen (kINPen09, kINPenMed, DBD) konnte keine signifikante Reduktion der vitalen Bakterien innerhalb des Biofilms im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachgewiesen werden.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der lebend/tot gefärbten Biofilme nach Plasma-Exposition für eine bzw. fünf Minuten bestätigen die Ergebnisse der Lebendkeimzahlbestimmung. Anhand der roten Fluoreszenz-Signale in Abbildung 10 ist zu erkennen, dass die Vitalität von *S. epidermidis* innerhalb des Biofilms sowohl durch den kHz-Jet als auch den kINPen08 reduziert wurde. Allerdings wird durch die grünen Fluoreszenz-Signale deutlich, dass vitale Bakterien innerhalb tieferer Schichten des Biofilms überleben konnten. Dieser Zustand zeigte sich auch bei den Biofilmen, die mit dem kINPen09 sowie dem kINPenMed behandelt wurden. Durch die DBD kam es zu keiner Reduktion der Vitalität von *S. epidermidis* innerhalb des Biofilms.

Zur morphologischen Untersuchung der Biofilme und Biofilm-Oberfläche nach Plasma-Exposition wurden REM-Bilder angefertigt (siehe Abbildung 11). Sowohl der kHz-Jet, als auch der kINPen08 zeigen deutliche Degradationsprozesse an den Biofilmen. Auch die dreidimensionale Struktur der Biofilme wurde durch den kHz-Jet sowie den kINPen08 deutlich aufgelöst bzw. abgetragen. Für die restlichen Plasma-Quellen der kINPen-Serie konnten derartige Effekte nicht nachgewiesen werden. Lediglich eine Veränderung der dreidimensionalen Anordnung konnte gezeigt werden. Die Behandlung mit der DBD zeigt dagegen keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Für alle weiteren folgenden Versuche kam ausschließlich der kINPen08 zum Einsatz.

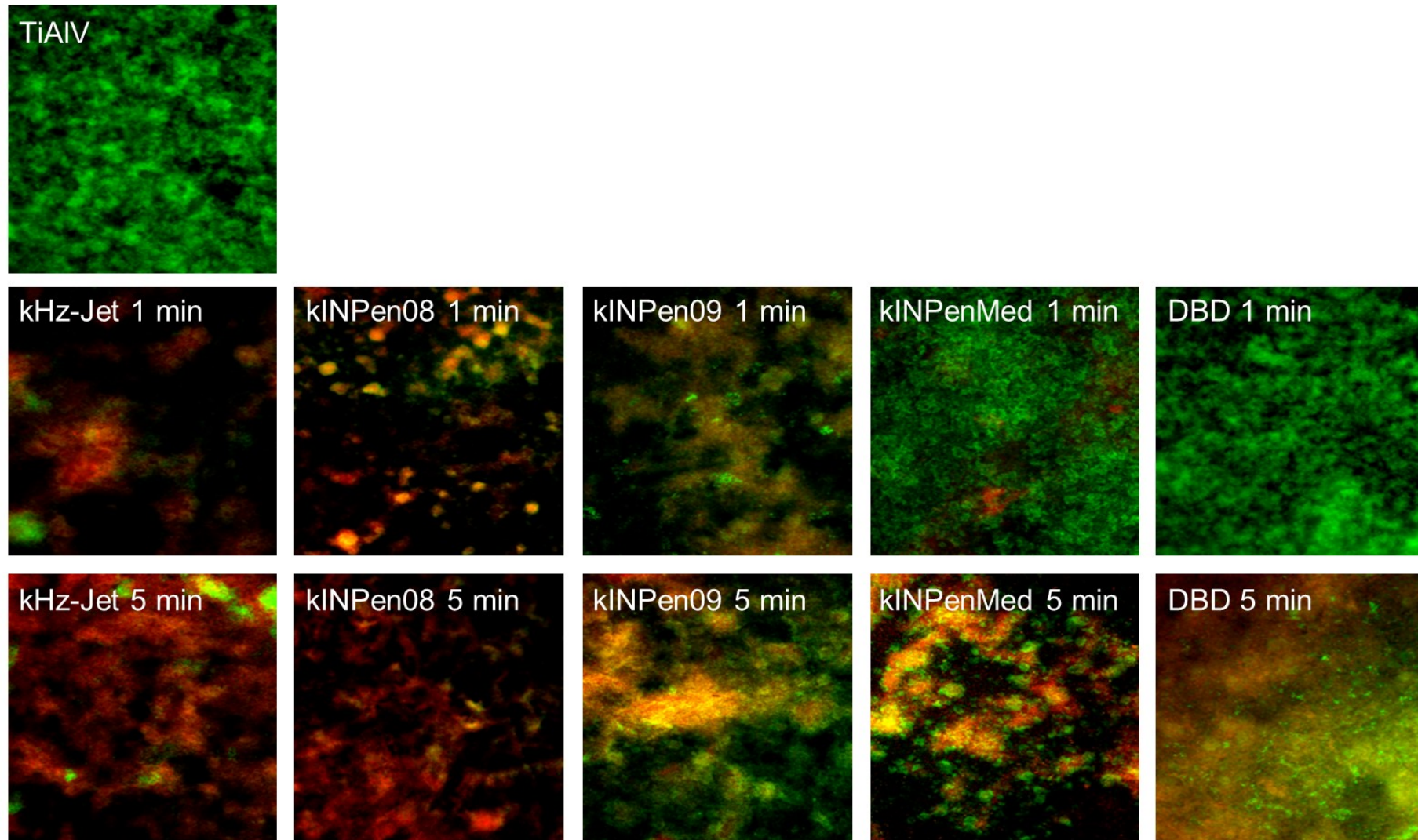


Abbildung 10: Zusammenfassende Fluoreszenzmikroskopische Darstellung. Lebend-Tot-Untersuchungen von *S. epidermidis* Biofilmen auf TCPS nach Plasma-Exposition für eine und fünf Minuten. Dargestellt ist die Plasma-exponierte Stelle auf der TCPS-Oberfläche. Vergrößerung: 200-fach. (Duske et al. 2015b)

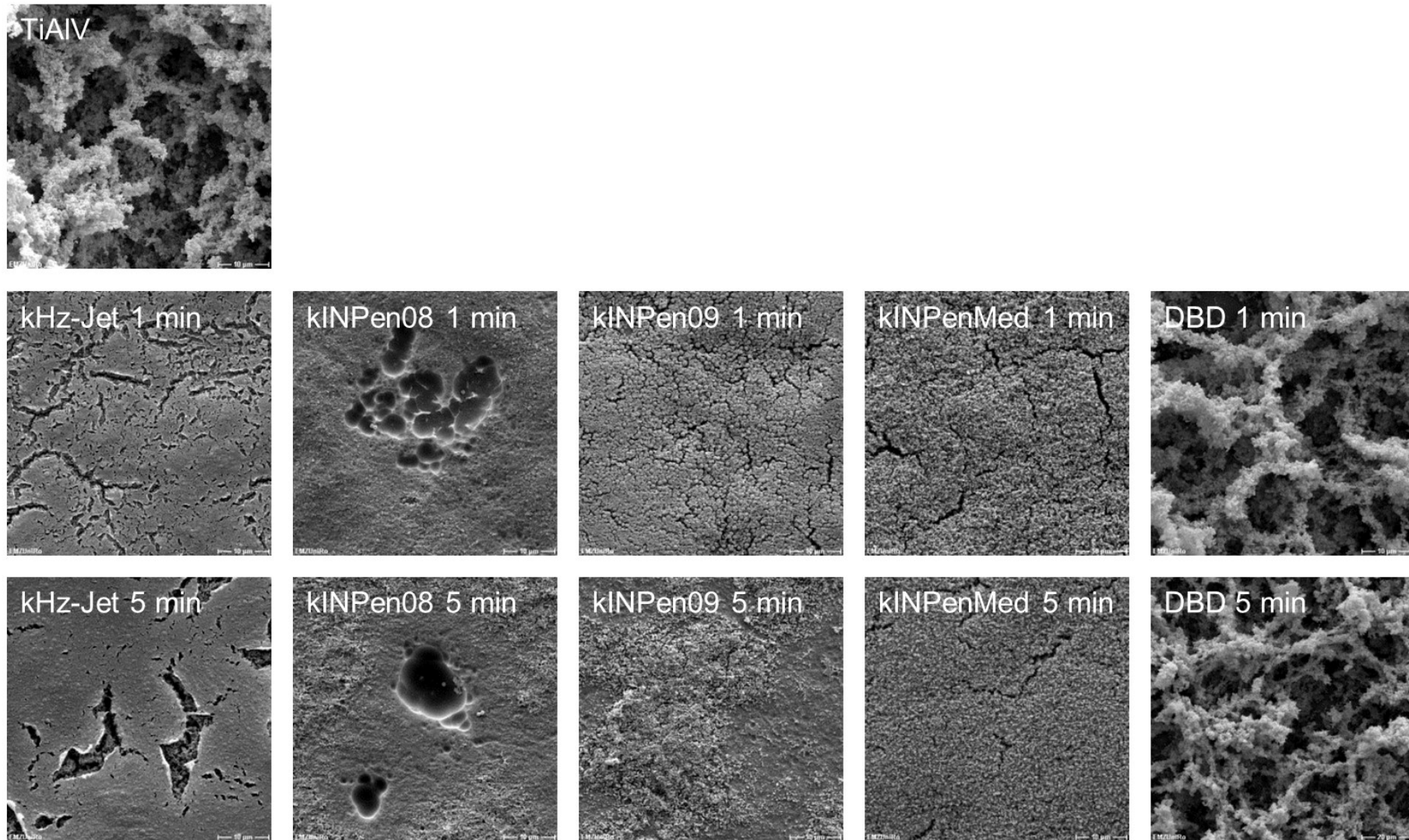


Abbildung 11: REM-Aufnahmen zur Untersuchung der Morphologie. Biofilme von *S. epidermidis* auf TCPS-Oberflächen nach Plasma-Exposition für eine bzw. fünf Minuten. Vergrößerung: 1000-fach. (Duske et al. 2015b)

3.1.2 Wirkung von kaltem Plasma auf die Vitalität von *S. epidermidis* innerhalb des Biofilms

Um den Bedingungen einer Implantatinfektion *in vitro* näher zu kommen, wurde *S. epidermidis* RP62A auf sterilen Ti6Al4V-Probekörpern für sieben Tage in TSB-Medium kultiviert. Anschließend wurden die Biofilme mit dem Plasma des kINPen08 am INP in Greifswald für eine bzw. drei Minuten behandelt. Als Kontrollen dienten Biofilme, die mit dem Argon-Sauerstoff-Gasgemisch ohne Zündung des Plasmas behandelt wurden, sowie native Biofilme, die lediglich dem Transportstress ausgesetzt waren. Plasma-, Gas-Behandlung sowie der Transport wurden in 1x PBS durchgeführt. In Abbildung 12 sind die Ergebnisse der Lebendkeimzahlbestimmung nach Plasma-bzw. Gas-Exposition dargestellt. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle konnte durch die 1-minütige Plasma-Behandlung mit dem kINPen08 eine signifikante Reduktion der Vitalität von *S. epidermidis* innerhalb des Biofilms um zwei Zehnerpotenzen (von $4,37 \cdot 10^8$ KBE/ml auf $1,91 \cdot 10^6$ KBE/ml) erreicht werden. Nach Plasma-Exposition über drei Minuten wurde ein ähnliches Ergebnis mit einer Reduktion der Vitalität um drei Größenordnungen beobachtet. Durch die Behandlung mit dem Argon-Sauerstoff-Gemisch wurde die Lebendkeimzahl signifikant von ursprünglich $4,4 \pm 0,19 \cdot 10^8$ KBE/ml nach einer Minute auf $1,3 \pm 0,07 \cdot 10^8$ KBE/ml und nach drei Minuten auf $1,28 \pm 0,04 \cdot 10^8$ KBE/ml reduziert.

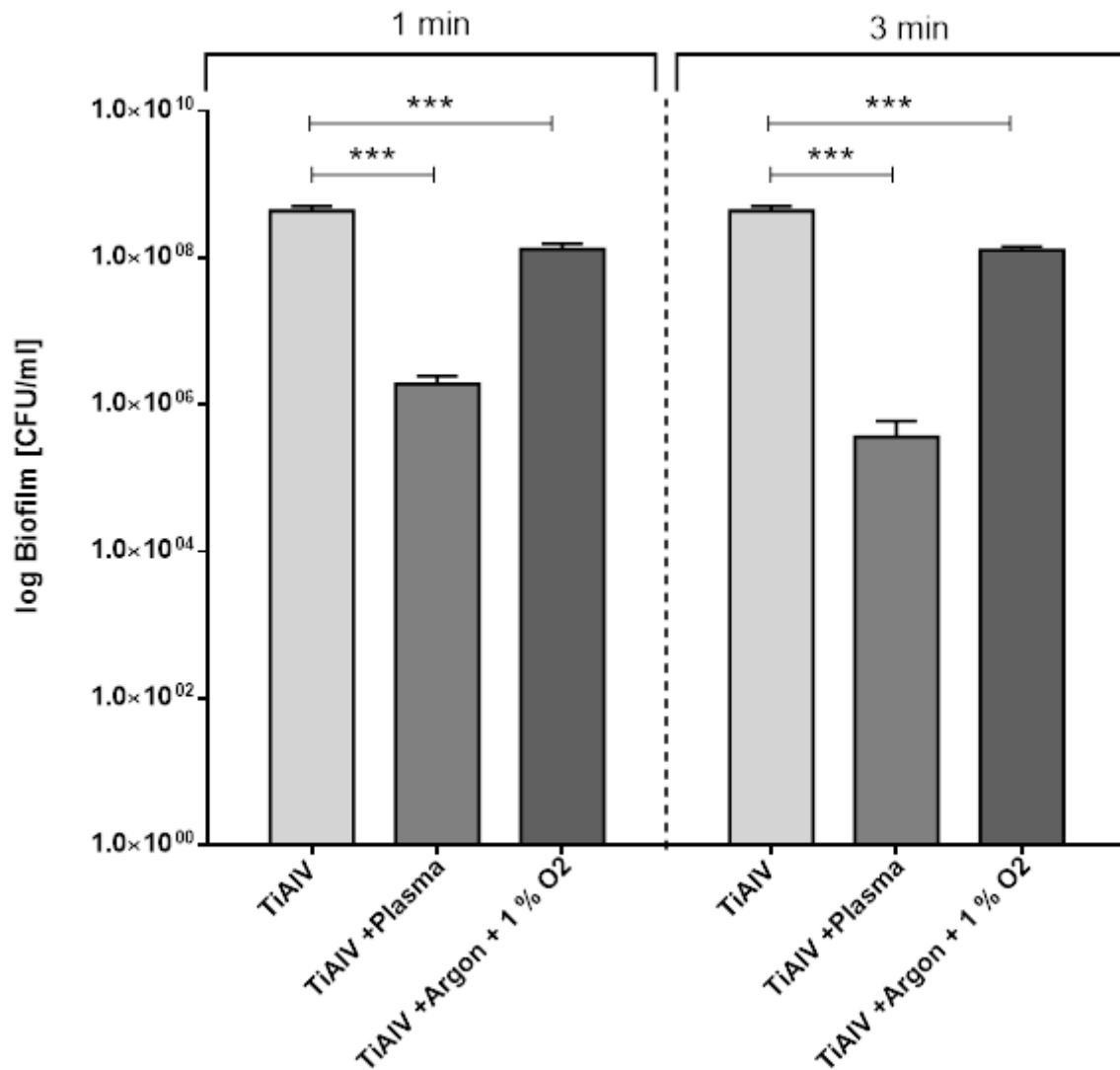


Abbildung 12: Darstellung der Lebendkeimzahlen (Mittelwert log KBE/ml \pm s.e.m.) von *S. epidermidis* im Biofilm (7 Tage, TiAlV) nach einer bzw. drei Minuten Plasma-bzw. Gasgemisch-Exposition und Spülung mit 1x PBS im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (TiAlV). 2-Way ANOVA (n=6), * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Um neben der Reduktion der Vitalität der Bakterien innerhalb des Biofilms auch eine Reduktion der Biofilmmasse durch das kalte Plasma zu untersuchen, wurde die Biofilmmasse mittels Kristall-Violett-Färbung quantifiziert. Dazu wurden die Biofilme auf den TiAlV-Probekörpern nach der Plasma-bzw. Gas-Behandlung mit 1x PBS gespült und anschließend mit Kristall-Violett gefärbt. Das Kristall-Violett wurde aus den Biofilmen gelöst und photometrisch die Absorption bestimmt. Die Absorption korreliert dabei direkt mit der Biofilmmasse, da durch das Kristall-Violett nur Biofilmstrukturen angefärbt werden, nicht aber der TiAlV-Probekörper.

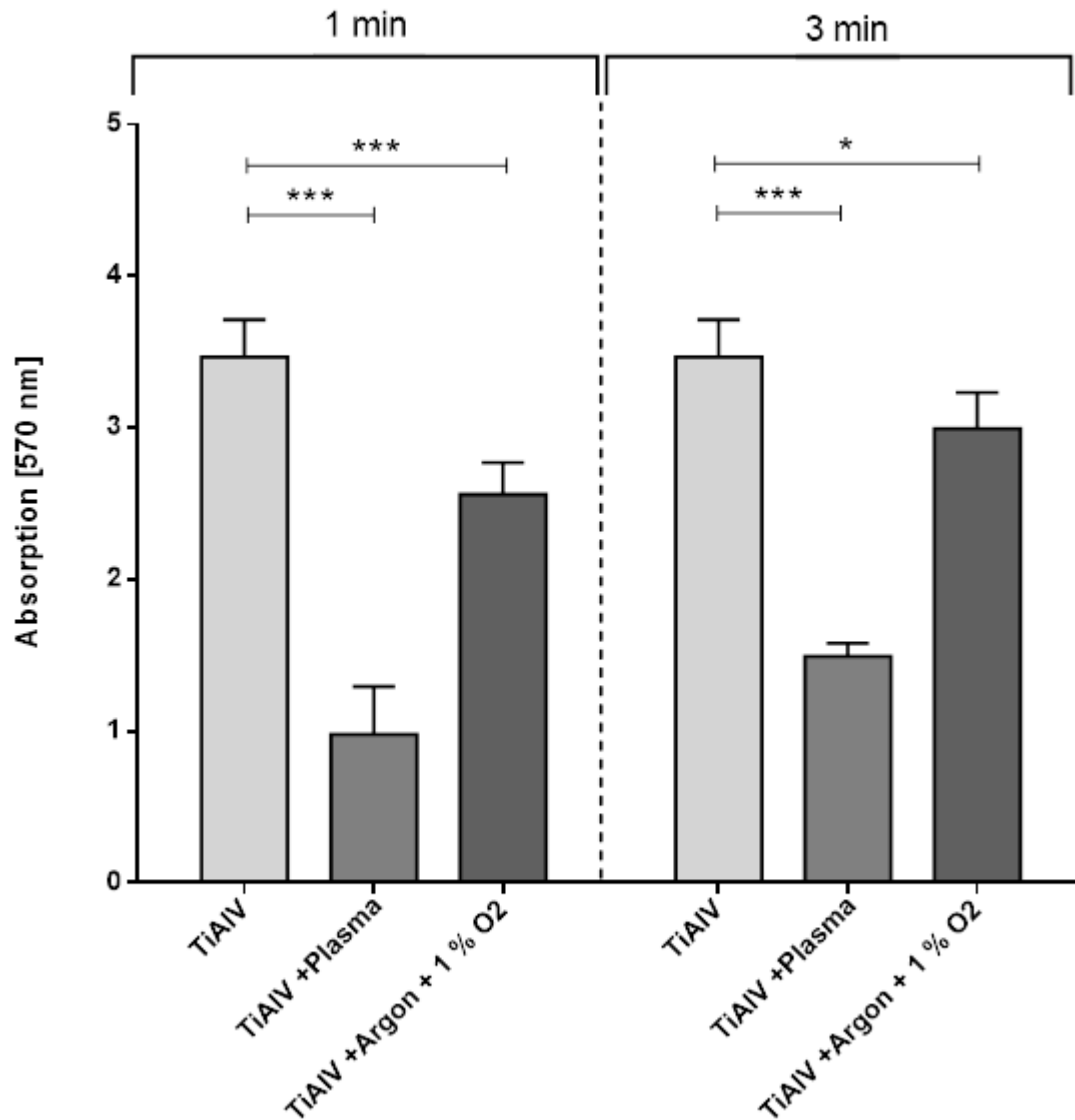


Abbildung 13: Darstellung der Biofilmmassen Quantifizierung (Absorption bei 570 nm) mittels Kristall-Violett. Biofilme von *S. epidermidis* auf TiAlV-Probekörpern nach Plasma-und Gasmisch-Exposition für eine bzw. drei Minuten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (TiAlV). Mittelwert \pm Standardabweichung. 2-Way ANOVA (n=6), * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

In Abbildung 13 sind die Absorptionen nach Kristall-Violett-Färbung zur Bestimmung der Biofilmmasse nach Plasma-bzw. Gas-Exposition dargestellt. Nach der Plasma-Behandlung für eine bzw. drei Minuten wurde eine signifikante Reduktion der Biofilmmasse um 72 % bzw. 57 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beobachtet. Die Biofilmmasse wurde durch das Gasmisch im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um 26 % bzw. 14 % nach einer bzw. drei Minuten reduziert.

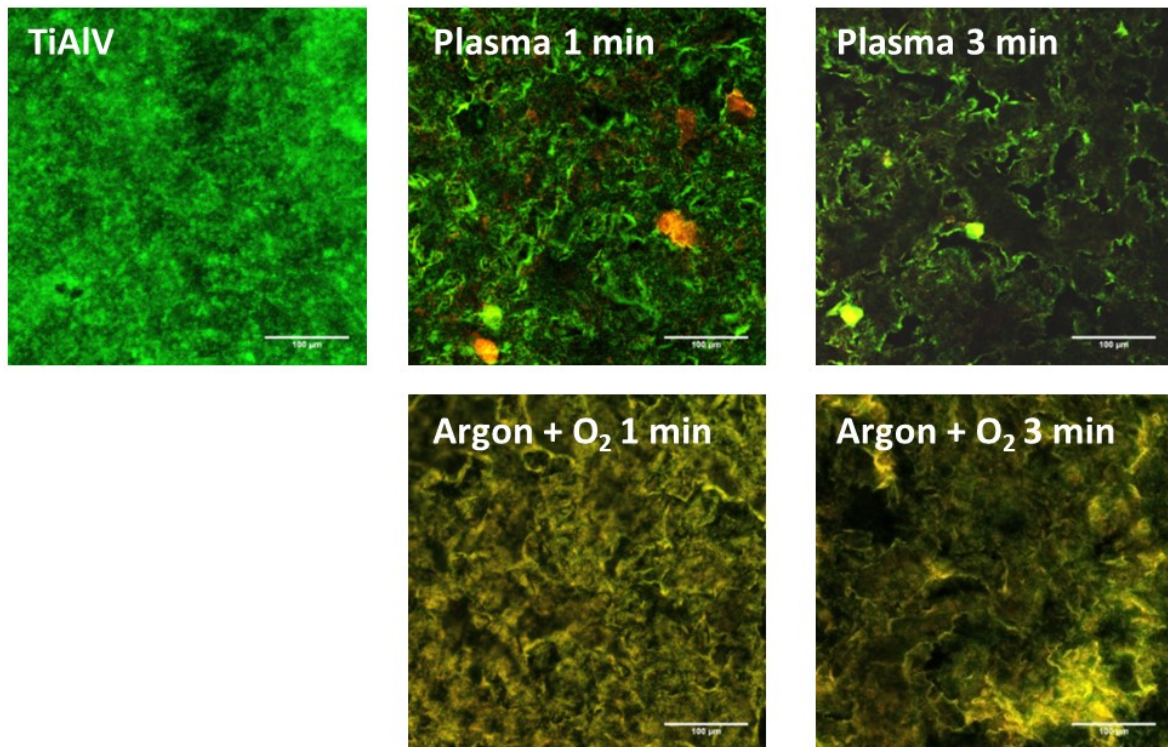


Abbildung 14: Mikroskopische Darstellung der Biofilme nach Plasma-bzw. Gasgemisch-Exposition. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Biofilme nach Lebend-Tot-Färbung. Grüne Fluoreszenzsignale stellen lebende Bakterien dar, während rote Fluoreszenzsignale tote Bakterien innerhalb des Biofilms signalisieren. Vergrößerung: 200-fach.

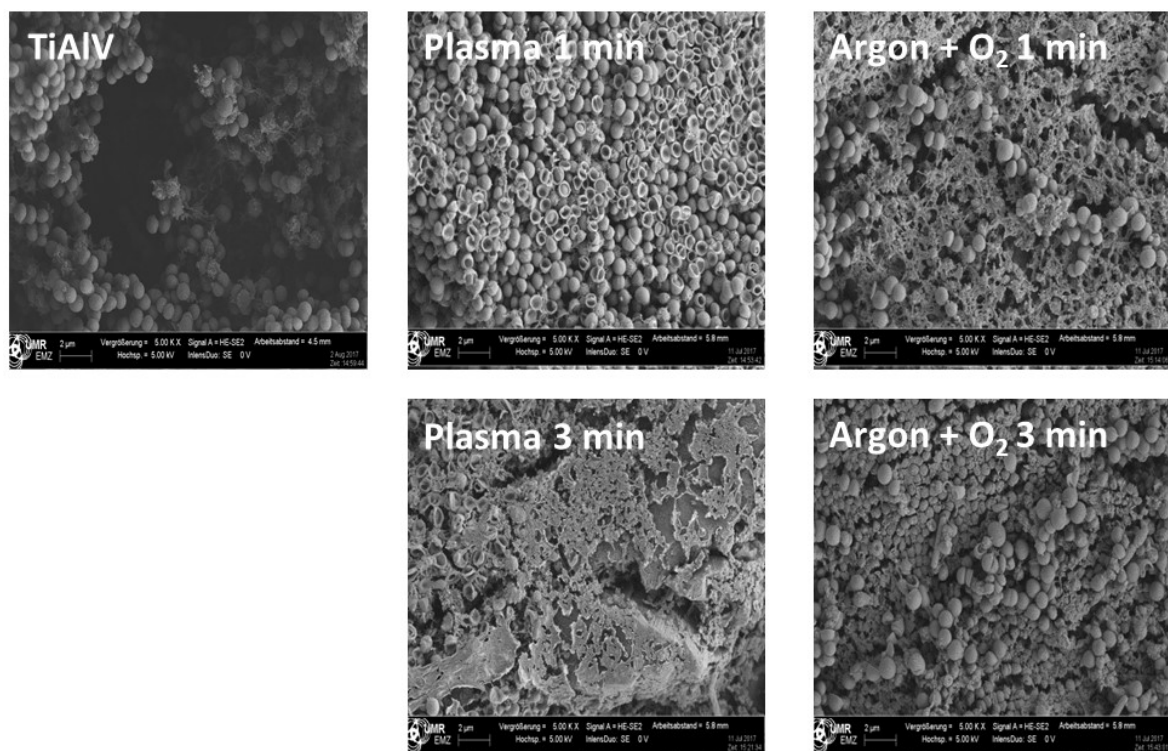


Abbildung 15: REM-Aufnahmen der Biofilm-Morphologie nach Plasma- bzw. Gas-Exposition für eine bzw. drei Minuten. Vergrößerung: 5000-fach.

Zur qualitativen Überprüfung der Vitalität von *S. epidermidis* innerhalb der Biofilme nach Plasma-bzw. Gasgemisch-Exposition wurden die Biofilme nach Lebend-Tot-Färbung Fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet (siehe Abbildung 14). Die qualitative Dokumentation der Biofilme bestätigt die Ergebnisse der Lebendkeimzahlbestimmung. Es ist erkennbar, dass nach Plasma-Behandlung die grünen Fluoreszenzsignale (lebend) deutlich reduziert sind und der Anteil roter Signale (tot) zunimmt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (TiAlV). Die Biofilmmasse ist nach Plasma-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls verringert. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich nach der Behandlung mit dem Argon-Sauerstoff-Gemisch ohne Plasma-Behandlung. Auch hier lässt sich eine Korrelation zwischen den Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen und den Ergebnissen der Lebendkeimzahlbestimmung erkennen. Auffällig ist hier allerdings, dass sich grüne und rote Fluoreszenzsignale vermischen, was darauf hinweist, dass das Gasgemisch die Vitalität der Bakterien nur in den oberen Schichten des Biofilms reduziert hat, in tieferen Schichten aber noch vitale *S. epidermidis* vorhanden sind (exemplarische CLSM-Serienaufnahmen siehe Anhang Abbildung 32 bis Abbildung 36). Im Vergleich zu den Plasma-behandelten Proben ist die Reduktion der Biofilmmasse nach Behandlung mit Argon-Sauerstoff weniger stark ausgeprägt. Die morphologischen Untersuchungen mittels REM weisen ebenfalls auf eine Schädigung der Struktur der Biofilme durch Plasma bzw. das Gasgemisch hin (siehe Abbildung 15). Nach einer Minute Plasma-Exposition ist deutlich zu erkennen, dass die oberen Schichten des Biofilms stark beschädigt wurden durch Auflösung der Bakterienzellwände und der EPS-Matrix. Auch nach drei Minuten Plasma-Exposition ist dieser Effekt zu beobachten. Nach der Behandlung mit dem Argon-Sauerstoffgemisch wurde mithilfe der REM-Analyse zwar eine Reduktion der Biofilmmasse und Auflösung der EPS festgestellt, eine Beschädigung der Bakterienzellwände wurde jedoch nicht beobachtet.

3.1.3 Revitalisierung von *S. epidermidis* innerhalb des Biofilms nach Plasma-Exposition

Um irreversible Beschädigungen der Biofilme durch Plasma zu untersuchen, wurden die Biofilme nach der Behandlung mit Plasma bzw. dem Gasgemisch mit 1x PBS gespült und anschließend für 24 h in TSB-Medium bei 37 °C, 5 % CO₂-Atmosphäre erneut kultiviert. Anschließend wurde die Vitalität der Biofilme sowie deren Biofilmmasse quantifiziert, sowie analog zu Absatz 3.1.2 qualitative Untersuchungen mittels Fluoreszenzmikroskopie und REM durchgeführt.

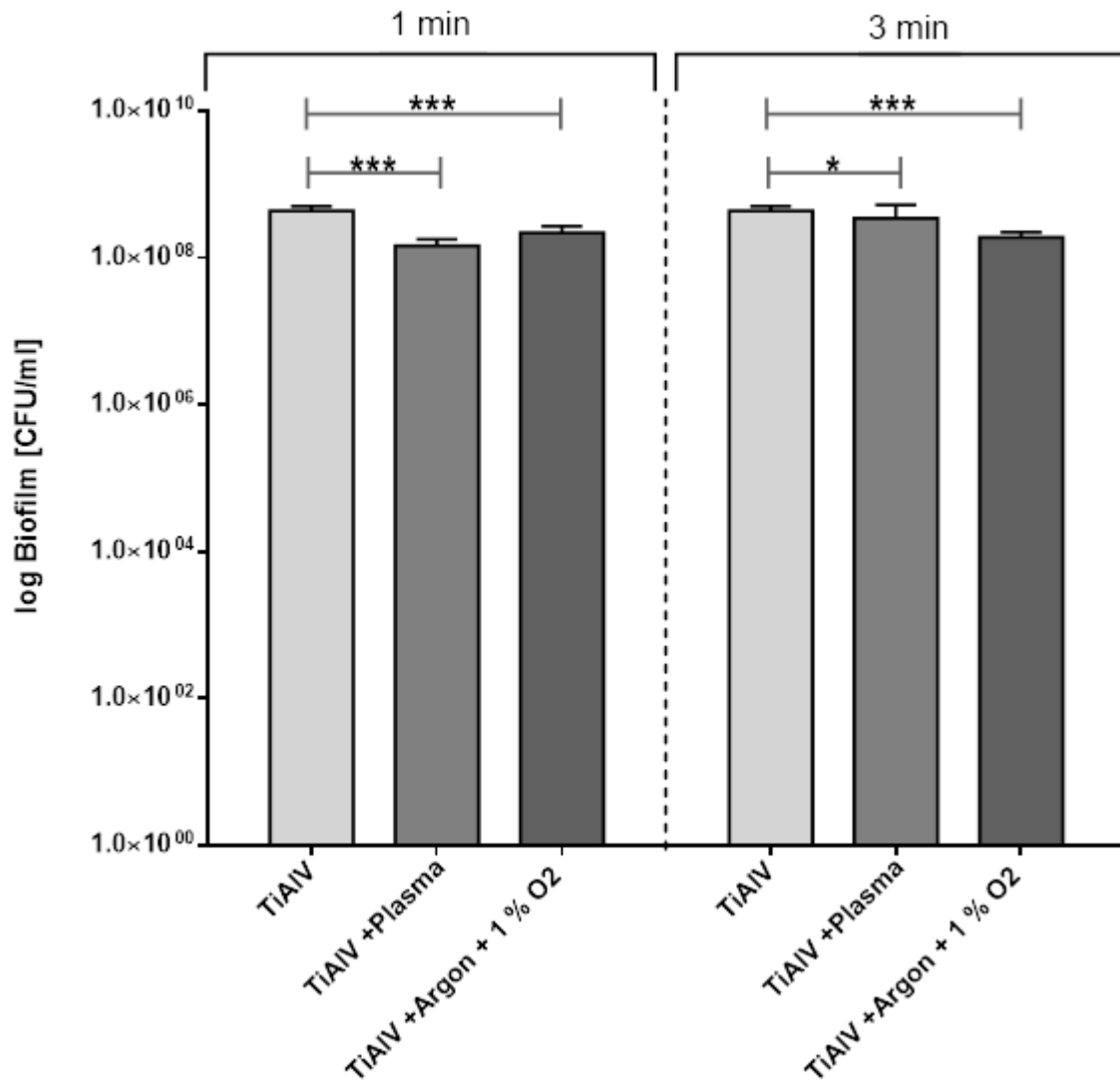


Abbildung 16: Darstellung der Lebendkeimzahlen nach Revitalisierung in TSB-Medium für 24 h (Mittelwert log KBE/ml \pm s.e.m.) von *S. epidermidis* im Biofilm nach einer bzw. drei Minuten Plasma-bzw. Gasmisch-Exposition und Spülung mit 1x PBS im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (TiAlV). 2-Way ANOVA (n=6), * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

In Abbildung 16 sind die Lebendkeimzahlen von *S. epidermidis* innerhalb der Biofilme nach Plasma-bzw. Gas-Exposition und einer erneuten Kultivierung für 24 h dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich alle Biofilme nach erneuter Kultivierung erholen und ähnliche Lebendkeimzahlen aufweisen wie die unbehandelte Kontrolle. Nach der Plasma-Behandlung für eine bzw. drei Minuten steigt die Vitalität der Biofilme von $1,9 \pm 0,15 \cdot 10^6$ KBE/ml bzw. $3,6 \pm 0,65 \cdot 10^5$ KBE/ml auf $1,5 \pm 0,12 \cdot 10^8$ KBE/ml bzw. $3,5 \pm 0,68 \cdot 10^8$ KBE/ml. Auch nach der Gas-Exposition ist deutlich zu erkennen, dass weder Plasma noch das Gasmisch eine irreversible Beschädigung der Biofilme hervorrufen.

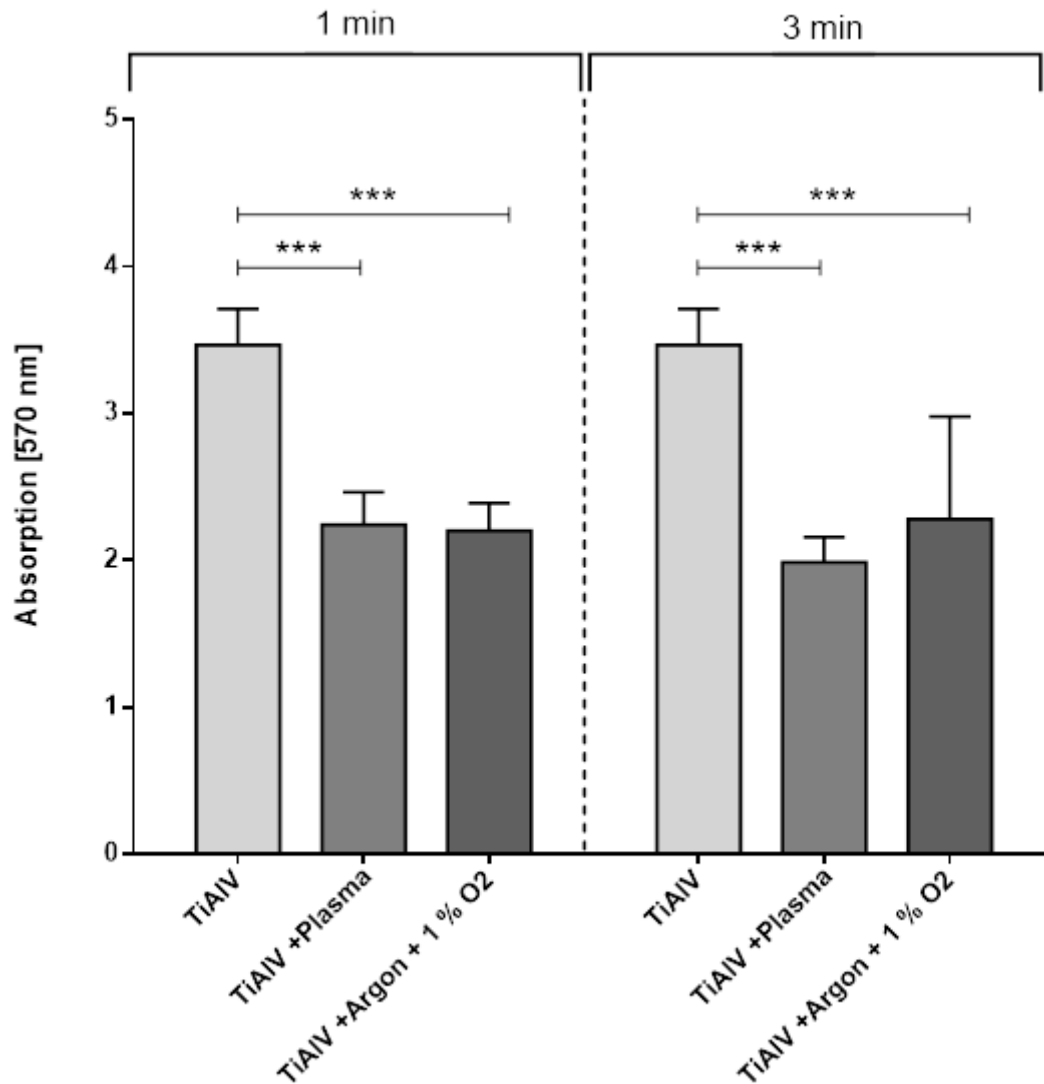


Abbildung 17: Darstellung der Biofilmmassen Quantifizierung (Absorption bei 570 nm) mittels Kristall-Violett nach Revitalisierung. Biofilme von *S. epidermidis* auf TiAlV-Probekörpern nach Plasma-und Gasgemisch-Exposition für eine bzw. drei Minuten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (TiAlV) und erneuter Kultivierung für 24 h in TSB-Medium. Mittelwert \pm Standardabweichung. 2-Way ANOVA ($n=6$), * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Nach der Bestimmung der Biofilmmasse mittels Kristall-Violett-Färbung wird deutlich, dass sich die Biofilme nach Plasma-bzw. Gas-Behandlung und anschließender 24 h-Kultivierung wieder erholen (siehe Abbildung 17). Bei ein-bzw. dreiminütiger Plasma-Behandlung erhöht sich die Biofilmmasse um 37 % bzw. 14 % nach der erneuten Kultivierung (siehe Vergleich Abbildung 13). Es ist aber auch deutlich zu erkennen, dass die Biofilmmasse im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle weiterhin reduziert bleibt. Ein signifikanter Einfluss der Argon-Sauerstoff-Behandlung auf die Biofilmmasse ist nach der erneuten Kultivierung erkennbar (siehe Vergleich Abbildung 13).

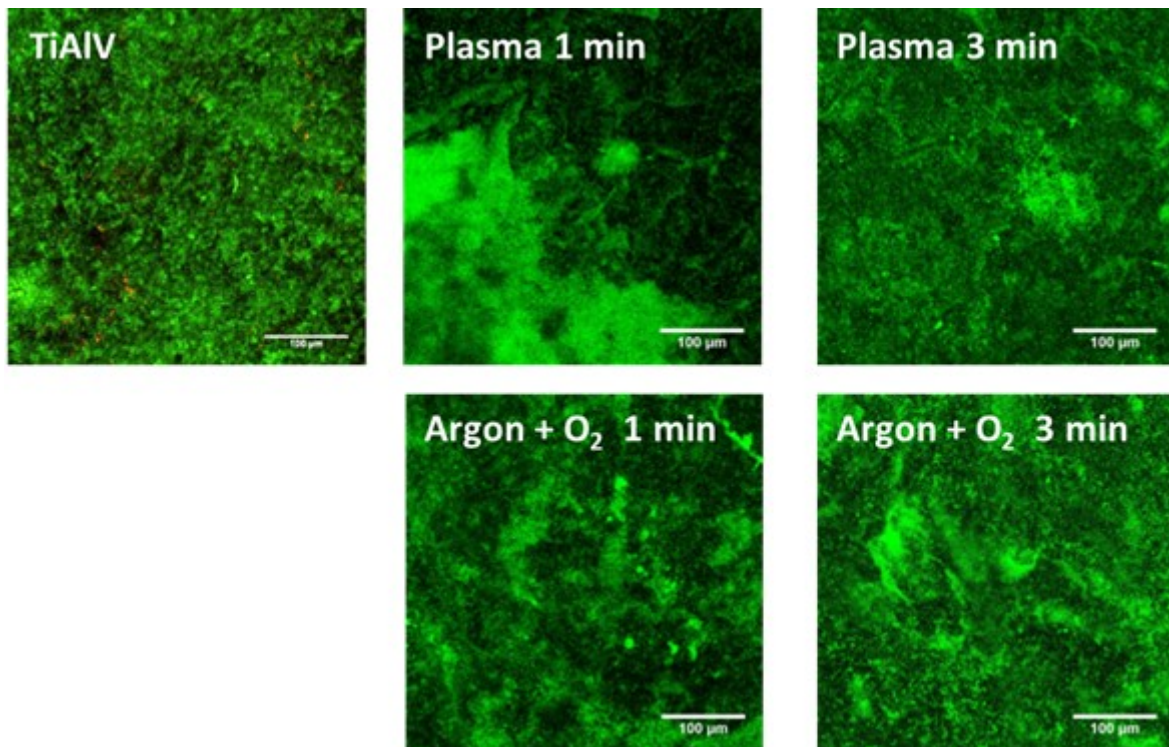


Abbildung 18: Mikroskopische Darstellung der Biofilme nach Plasma-bzw. Gasgemisch-Exposition und erneuter Kultivierung für 24 h in TSB-Medium. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Biofilme nach Lebend-Tot-Färbung. Grüne Fluoreszenzsignale stellen lebende Bakterien dar, während rote Fluoreszenzsignale tote Bakterien innerhalb des Biofilms signalisieren. Vergrößerung: 200-fach.

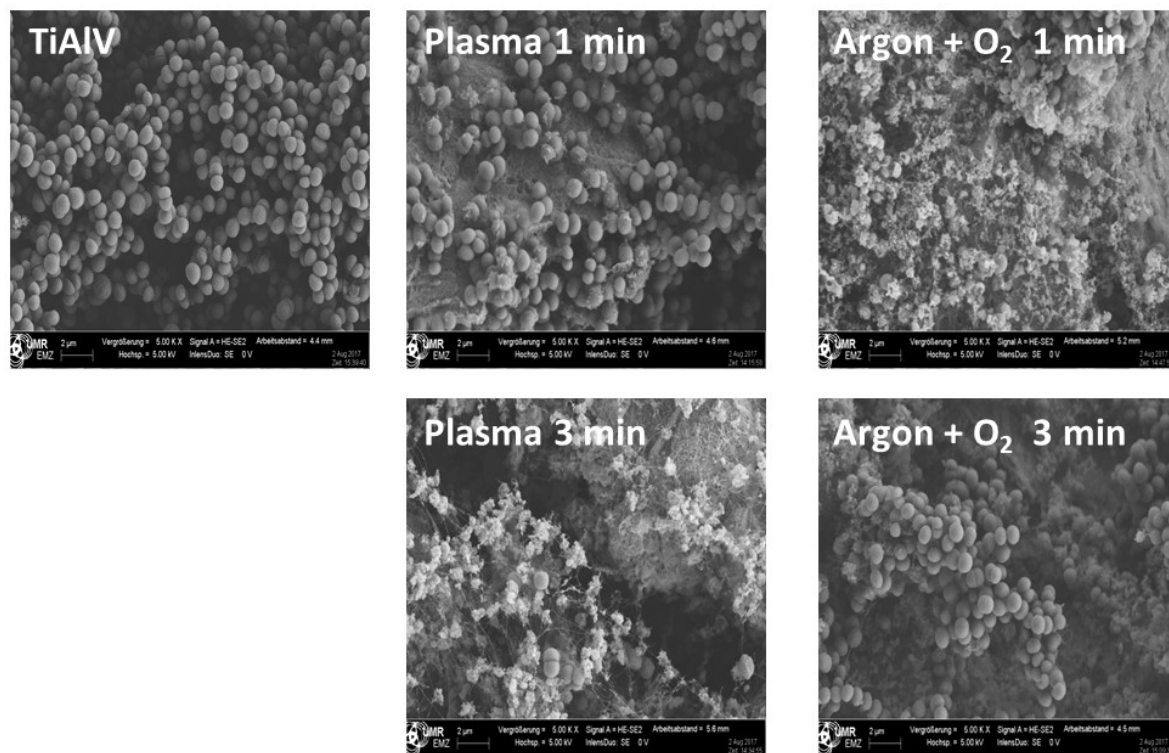


Abbildung 19: REM-Aufnahmen der Biofilm-Morphologie nach Plasma- bzw. Gas-Exposition für eine bzw. drei Minuten und Revitalisierung für 24 h. Vergrößerung: 5000-fach.

Die qualitative Überprüfung der Revitalisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie und REM nach Plasma-bzw. Gas-Exposition bestätigt die Ergebnisse der Lebendkeimzahlbestimmung sowie der Quantifizierung der Biofilmmasse. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und den Biofilmen direkt nach der Plasma-Behandlung ist zu erkennen, dass sich die Biofilme vollständig erholt haben, die Biofilmmasse hingegen weiterhin reduziert bleibt. Anhand der vorwiegend grünen Fluoreszenzsignale nach Lebend-Tot-Färbung wird deutlich, dass die Vitalität von *S. epidermidis* innerhalb der Biofilme nach Plasma-Exposition nicht irreversibel beeinflusst wird (exemplarische CLSM-Serienaufnahmen siehe Anhang Abbildung 37 bis Abbildung 40). Die morphologischen Veränderungen der EPS wie sie schon direkt nach der Plasma- und Gas-Behandlung zu beobachten waren (siehe Abbildung 19) bleiben auch nach 24 h erneuter Kultivierung vorhanden.

3.2 Untersuchung der Empfindlichkeit von *S. epidermidis* gegenüber ausgewählter Antibiotika nach Plasma-Behandlung

3.2.1 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Gentamicin nach Plasma-Exposition

Auf Grund der bekannten Resistenz von *S. epidermidis* RP62A gegenüber Gentamicin sowie der weiterhin verminderten Sensibilität gegenüber Gentamicin innerhalb eines Biofilms, wurde untersucht, ob eine Plasma-Behandlung der Biofilme von *S. epidermidis* RP62A zu einer verbesserten Wirksamkeit von Gentamicin führen würde. So wurde zunächst die minimale Hemmkonzentration (MHK) von Gentamicin-Sulfat (GM-Sulfat) nach Plasma-bzw. Gas-Behandlung mit Hilfe von E-Test-Streifen festgestellt. Dazu wurden die Biofilme mittels Ultraschall nach der Behandlung mit Plasma bzw. Gas von der Oberfläche der Probekörper entfernt, entsprechend der Probe mit der geringsten OD₆₀₀ verdünnt und anschließend auf TSB-Agar-Platten ausplattiert und mit einem E-Test-Streifen versehen. Nach 24 stündiger Kultivierung wurde anhand der entstandenen Hemmhöfe um den E-Test-Streifen herum die MHK bestimmt.

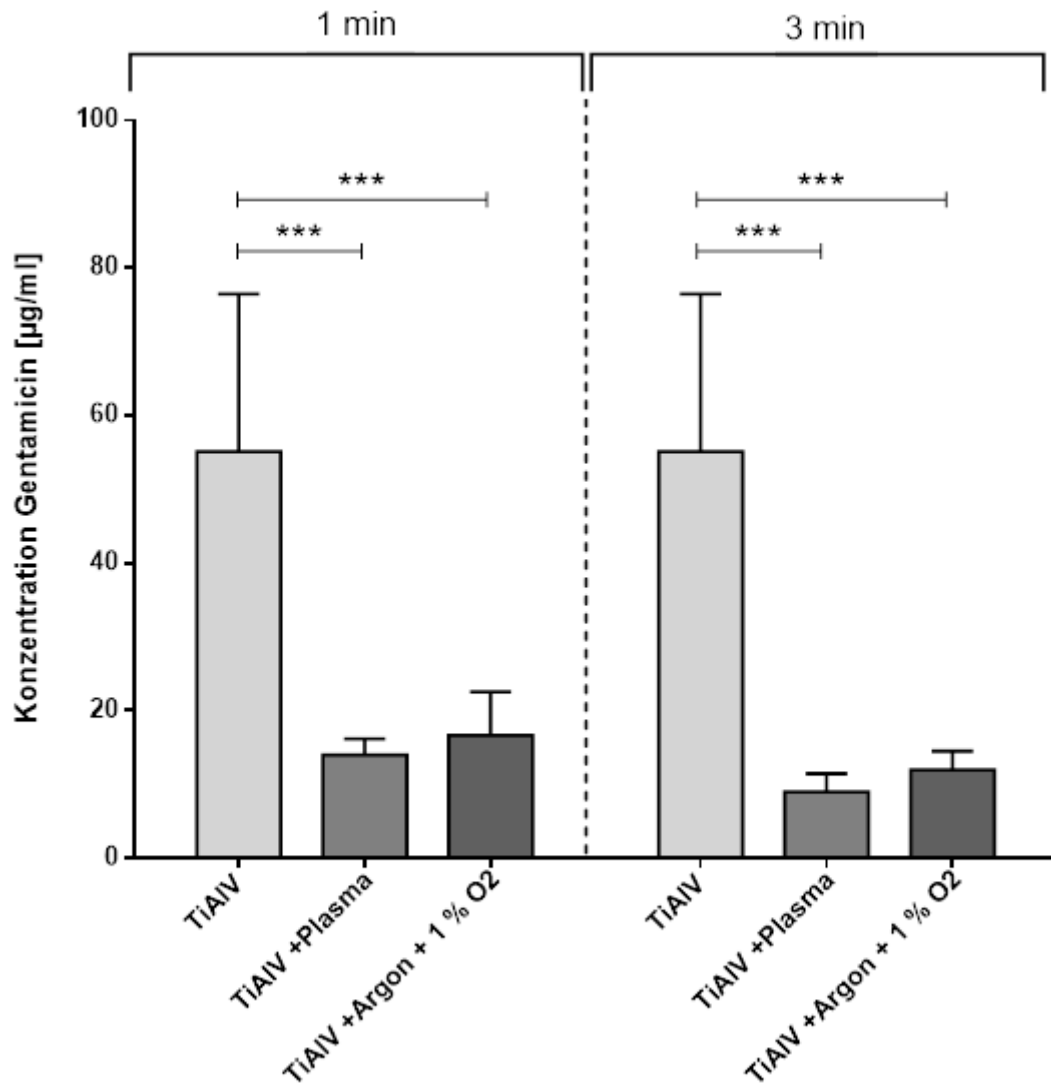


Abbildung 20: MHK-Bestimmung von Gentamicin gegen *S. epidermidis* RP62A (Mittelwert \pm Standardabweichung Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]). MHK nach Plasma-bzw. Gas-Exposition im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (TiAlV). 2-Way ANOVA ($n \geq 3$), * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

In Abbildung 20 sind die Ergebnisse der MHK-Bestimmung für Gentamicin nach Plasma- bzw. Gasmisch-Behandlung dargestellt. Sowohl die Plasma- als auch die Gas-Exposition der Biofilme führten zu einer signifikanten Erhöhung der Empfindlichkeit von *S. epidermidis* gegenüber GM-Sulfat. Nach der Plasmabehandlung für eine bzw. drei Minuten kam es zu einer signifikanten Reduktion der benötigten wachstumshemmenden Konzentration von GM-Sulfat um 41 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 46 $\mu\text{g/ml}$. Nach der Gas-Behandlung der Biofilme war dieser Effekt ebenfalls deutlich zu sehen. Auch hier verringerte sich die wachstumshemmende Dosis um 38 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 43 $\mu\text{g/ml}$ nach einer bzw. drei Minuten Behandlungszeit.

3.2.2 Untersuchung zur Empfindlichkeit des Biofilms von *S. epidermidis* in Anwesenheit von Gentamicin-Sulfat nach Plasma-Behandlung

Um die Empfindlichkeit der Biofilme nach der Plasma-bzw. Gas-Behandlung gegenüber Gentamicin zu untersuchen, wurden diese nach der Behandlung für 24 h in GM-haltigem (3,75 mg/ml) TSB-Medium inkubiert. Anschließend wurden wie schon unter Abschnitt 3.1.2 beschrieben, die Lebendkeimzahlen, Biofilmmasse, Morphologie und Vitalität der Biofilme untersucht und dokumentiert.

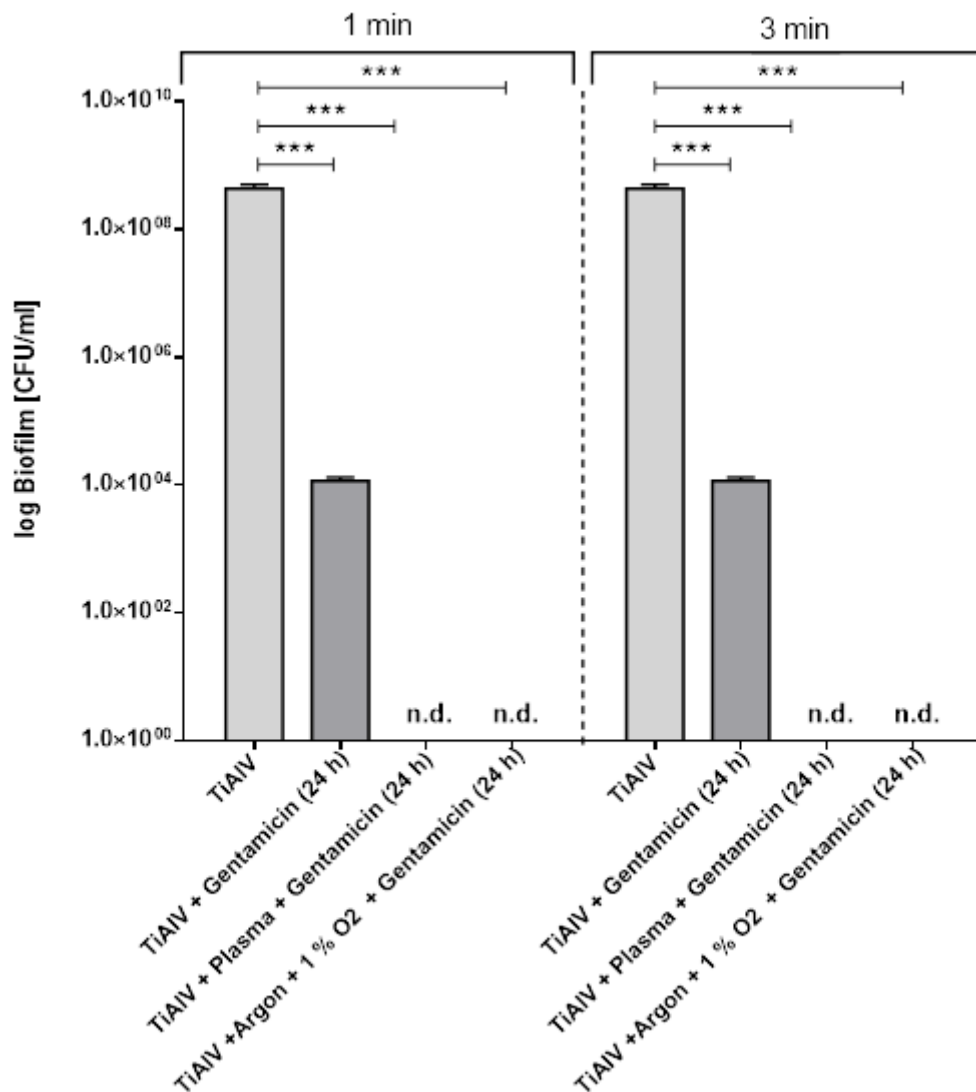


Abbildung 21: Darstellung der Lebendkeimzahlen nach Inkubation in TSB-Medium und GM-Sulfat für 24 h (Mittelwert log KBE/ml \pm s.e.m.) von *S. epidermidis* im Biofilm nach einer bzw. drei Minuten Plasma-bzw. Gasgemisch-Exposition. Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (TiAlV) und der unbehandelten Kontrolle nach 24 h Inkubation in TSB-Medium und GM-Sulfat. Mit n.d. sind nicht detektierbare Ergebnisse dargestellt. 2-Way ANOVA (n=6), * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

Anhand von Abbildung 21 lässt sich erkennen, dass die nativen Biofilme auf TiAlV der unbehandelten Kontrolle unempfindlich gegen das bakterizide Antibiotikum Gentamicin sind. Auch

wenn eine signifikante Reduktion der Vitalität von *S. epidermidis* innerhalb der Biofilme um mindestens vier Zehnerpotenzen erzielt wurde. Nach Plasma- bzw. Gas-Behandlung und Inkubation mit GM-Sulfat für 24 h konnte keine Vitalität von *S. epidermidis* nachgewiesen werden.

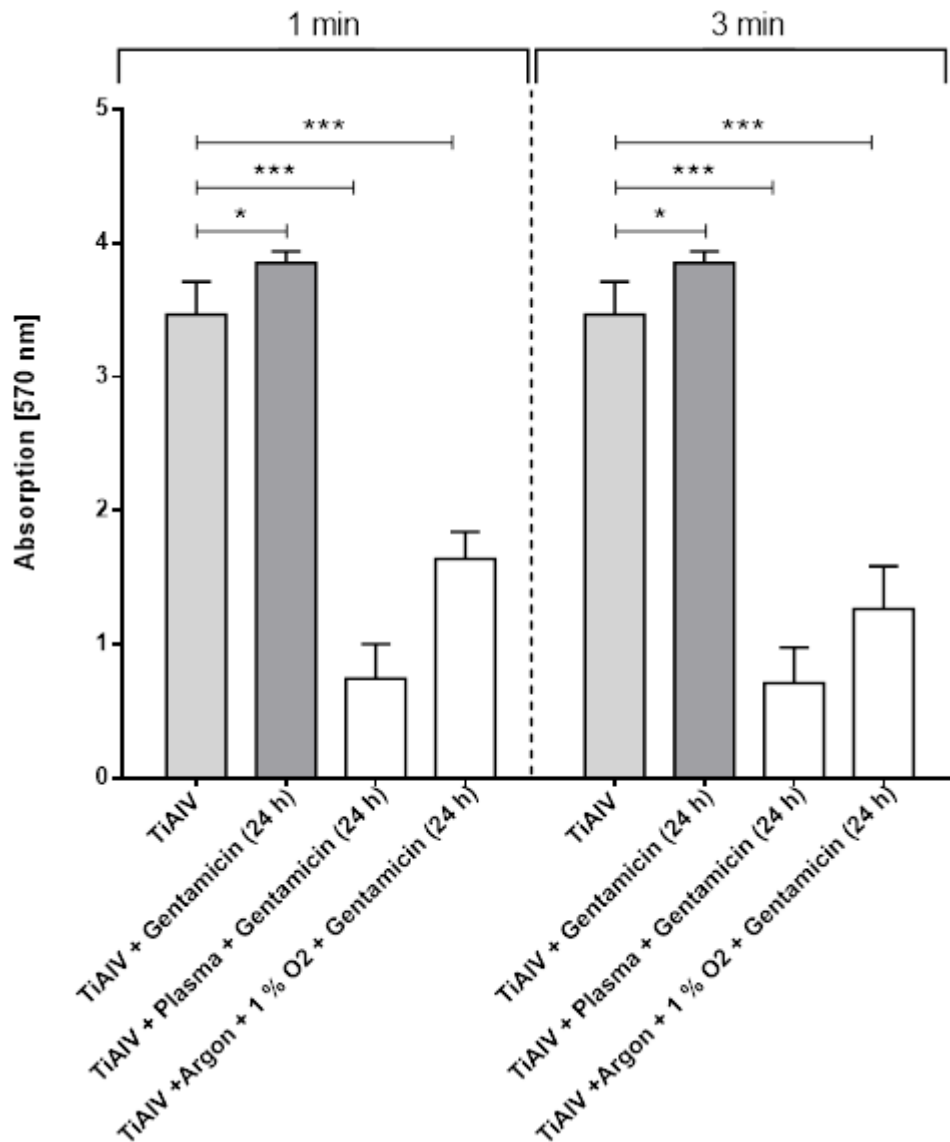


Abbildung 22: Darstellung der Biofilmmassen Quantifizierung (Absorption bei 570 nm) mittels Kristall-Violett nach Kultivierung der Biofilme in TSB-Medium und GM-Sulfat für 24 h. Biofilme von *S. epidermidis* auf TiAlV-Probekörpern nach Plasma-und Gasgemisch-Exposition für eine bzw. drei Minuten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (TiAlV) und erneuter Kultivierung für 24 h in TSB-Medium und GM-Sulfat. Mittelwert \pm Standardabweichung. 2-Way ANOVA (n=6), * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Die Biofilmmassen-Quantifizierung macht deutlich, dass die Biofilme nach der Plasma-bzw. Gas-Exposition zwar nicht vital sind (siehe Abbildung 21), die Strukturen aber dennoch auf den Probekörpern bestehen bleiben. Im Vergleich zu den Biofilmen, die direkt nach der Plasma-Behandlung untersucht wurden, konnte festgestellt werden, dass sich die Biofilmmasse um 24 % bzw. 52 % nach einer bzw. drei Minuten und einer zusätzlichen Inkubation

mit TSB-Medium und GM-Sulfat verringerte (siehe Vergleich Abbildung 13). Nach der Gas-Behandlung und erneuter Inkubation in Gentamicin-haltigem Medium reduzierte sich die Biofilmmasse um 36 % bzw. 58 % im Vergleich zur direkten Behandlung mit dem Argon-Sauerstoff-Gemisch (siehe Vergleich Abbildung 13).

Anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nach Lebend-Tot-Färbung (siehe Abbildung 23) ist die Reduktion der Vitalität nach Plasma-bzw. Gas-Exposition und Kultivierung in TSB-Medium und GM-Sulfat nachzuvollziehen. Die nicht eindeutig grünen Fluoreszenzsignale der Aufnahmen der Biofilme nach Gas-Exposition machen allerdings deutlich, dass in den tieferen Schichten der Biofilme noch vitale Bakterien vorhanden sind, welche mittels Lebendkeimzahlbestimmung allerdings nicht nachweisbar waren (exemplarische CLSM-Serienaufnahmen siehe Anhang Abbildung 41 und Abbildung 42). Die REM-Aufnahmen bestätigen dieses Ergebnis (siehe Abbildung 24). So sind auf den Aufnahmen nach der Gas-Behandlung und Kultivierung in TSB-Medium und GM-Sulfat deutlich noch intakte Bakterien innerhalb der Biofilme zu erkennen. Im Vergleich dazu, sind auf den Aufnahmen der Biofilme nach Plasma-Exposition und Inkubation in Gentamicin-haltigem Medium deutlich eine Reduktion der Biofilmmasse sowie eine Zunahme der Beschädigung von *S. epidermidis* innerhalb der Biofilme zu erkennen. Beide mikroskopischen Untersuchungen unterstützen die Ergebnisse der Biofilmmassen-Quantifizierung, da auch an Hand der Bilder keine vollständige Entfernung der Biofilmmasse durch die Inkubation in Gentamicin-haltigem Medium nachgewiesen wurde.

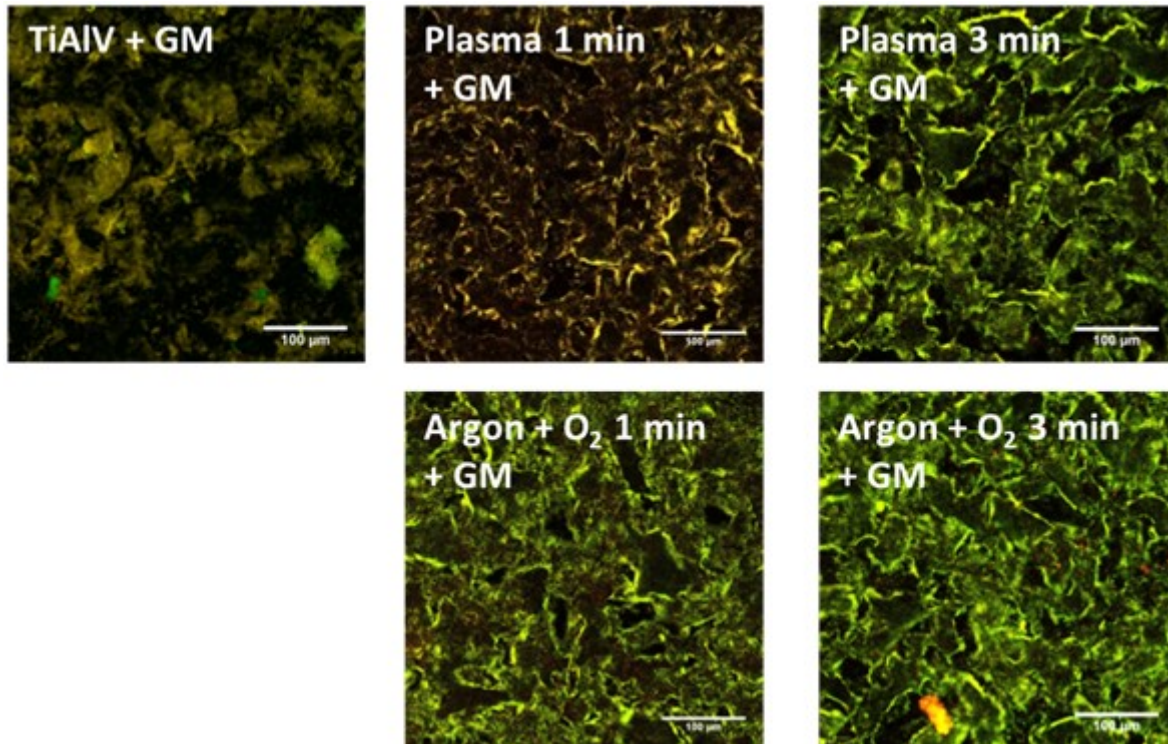


Abbildung 23: Mikroskopische Darstellung der Biofilme nach Plasma-bzw. Gasgemisch-Exposition und erneuter Kultivierung für 24 h in TSB-Medium und GM-Sulfat (GM). Als Kontrolle sind unbehandelte Biofilme nach Kultivierung in GM-haltigem Medium dargestellt (TiAlV + GM). Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Biofilme nach Lebend-Tot-Färbung. Vergrößerung: 200-fach.

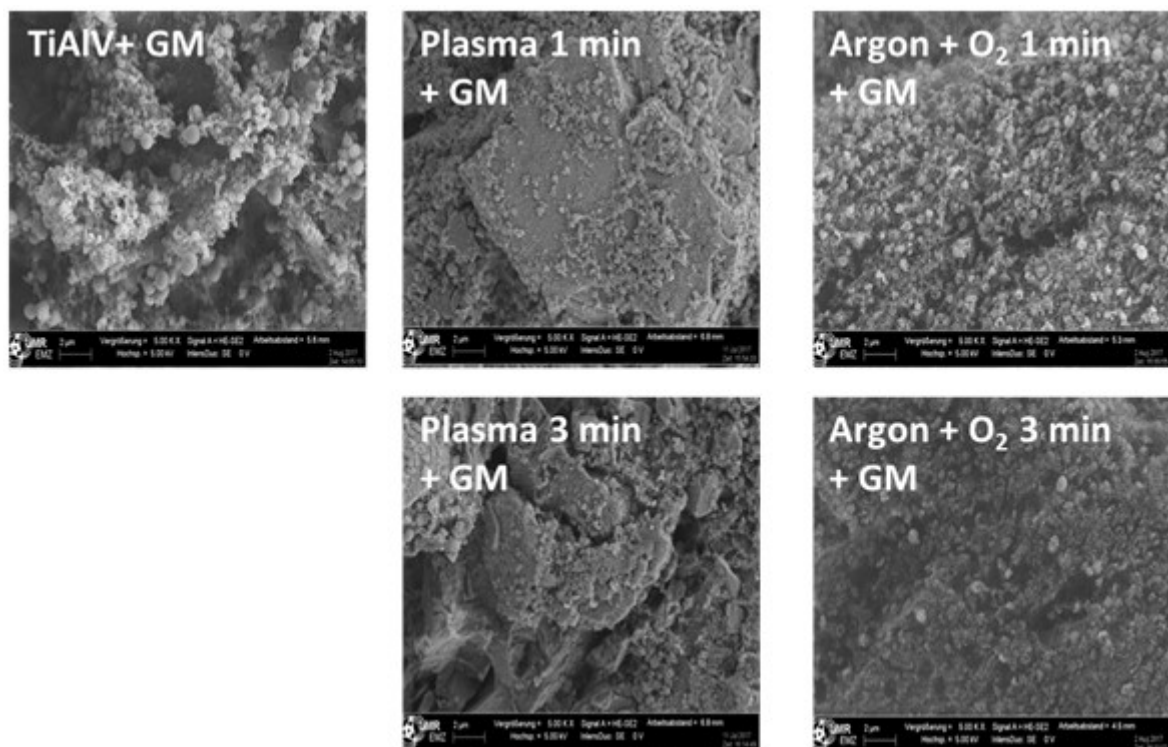


Abbildung 24: REM-Aufnahmen der Biofilm-Morphologie nach Plasma- bzw. Gas-Exposition für eine bzw. drei Minuten und Kultivierung in TSB-Medium und GM-Sulfat für 24 h. Vergrößerung: 5000-fach.

3.2.3 Revitalisierung des Biofilms von *S. epidermidis* in Anwesenheit von Gentamicin-Sulfat nach Plasma-Behandlung

Wie in Abschnitt 3.2.2 dargestellt, konnte durch Kultivierung der Biofilme nach Plasma- und Gas-Exposition eine vollständige Reduktion der Vitalität von *S. epidermidis* innerhalb der Biofilme erzielt werden. Anhand der Quantifizierung der Biofilmmasse sowie der mikroskopischen Aufnahmen (siehe Abbildung 22 bis Abbildung 24) konnte allerdings auch gezeigt werden, dass die Biofilme noch immer auf den Oberflächen der Probekörper vorhanden waren. Somit wurde untersucht, in wieweit die Biofilme nach erneuter Kultivierung weiterhin vermehrungsfähig und vital sind. Dazu wurden die Biofilme nach der Plasma-bzw. Gas-Behandlung und Kultivierung für 24 h in TSB-Medium und GM-Sulfat erneute für weitere 24 h in TSB-Medium inkubiert. Anschließend wurde analog zu den vorherigen Versuchen die Vitalität der Biofilme, deren Biofilmmasse, Änderungen der Morphologie und Struktur analysiert.

In Abbildung 25 sind die Lebendkeimzahlen der Biofilme nach Plasma-bzw. Gas-Exposition, Kultivierung in GM-haltigem Medium und anschließender Revitalisierung dargestellt. So ist deutlich zu erkennen, dass die Plasma-Behandlung für eine bzw. drei Minuten, Kultivierung in GM-haltigem Medium und erneute Kultivierung in TSB-Medium weiterhin zu einer vollständigen Reduktion der Vitalität der Biofilme führt. Allerdings zeigt die Kristall-Violett-Färbung der Plasma- und Gentamicin behandelten Biofilme einen Anstieg der Biofilmmasse um 41 % nach einer Minute bzw. um 15 % nach drei Minuten Plasmaexposition. Weiterhin ist auf den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen deutlich zu erkennen, dass noch grüne Fluoreszenzsignale detektierbar waren. Somit ist darauf zu schließen, dass auch in diesem Fall die Biofilme weiterhin vermehrungsfähig bleiben, lediglich mittels Lebendkeimzahlbestimmung nicht nachweisbar sind. Anhand der REM-Aufnahmen ist allerdings zu erkennen, dass der Biofilm in seiner Struktur aufgelöst vorliegt, d.h. die EPS-Matrix beschädigt sowie einzelnen Schichten des Biofilms degradiert wurden. Auch die Beschädigung einzelner *S. epidermidis* Bakterien wird deutlich. Im Gegensatz dazu zeigte der Nachweis der Lebendkeimzahl der Biofilme mit Argon-Sauerstoffgemisch-Behandlung nach Antibiose und Revitalisierung einen erneuten Anstieg der Vitalität von *S. epidermidis*. Die Quantifizierung der Biofilmmasse bestätigt dieses Ergebnis. So nimmt diese nach der Revitalisierung der Gas- und Gentamicin-exponierten Biofilme um 13 % bzw. 24 % nach einer bzw. drei Minuten zu (siehe Abbildung 26 im Vergleich Abbildung 22). Mittels fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen nach Lebend-Tot-Färbung wird deutlich, dass die Biofilme nach Gas- und Gentamicin-Exposition wieder revitalisieren. Die Struktur dieser Biofilme wurde allerdings deutlich gestört (siehe Abbildung 27, exemplarische CLSM-Serienaufnahmen siehe Anhang Abbildung 43 bis Abbildung 46). So sind weder auf den Fluoreszenzmikroskopischen Bildern, als auch auf den REM-Aufnahmen homogene Biofilme nach Gas- und Gentamicin-Exposition nachzuweisen (siehe Abbildung 28). Somit ist auch hier zu erkennen, dass die Effekte nach der Behandlung

mit dem Gasgemisch und einer Kultivierung in TSB-Medium und GM-Sulfat wie in Abschnitt 3.2.2 dargestellt, nur temporär sind.

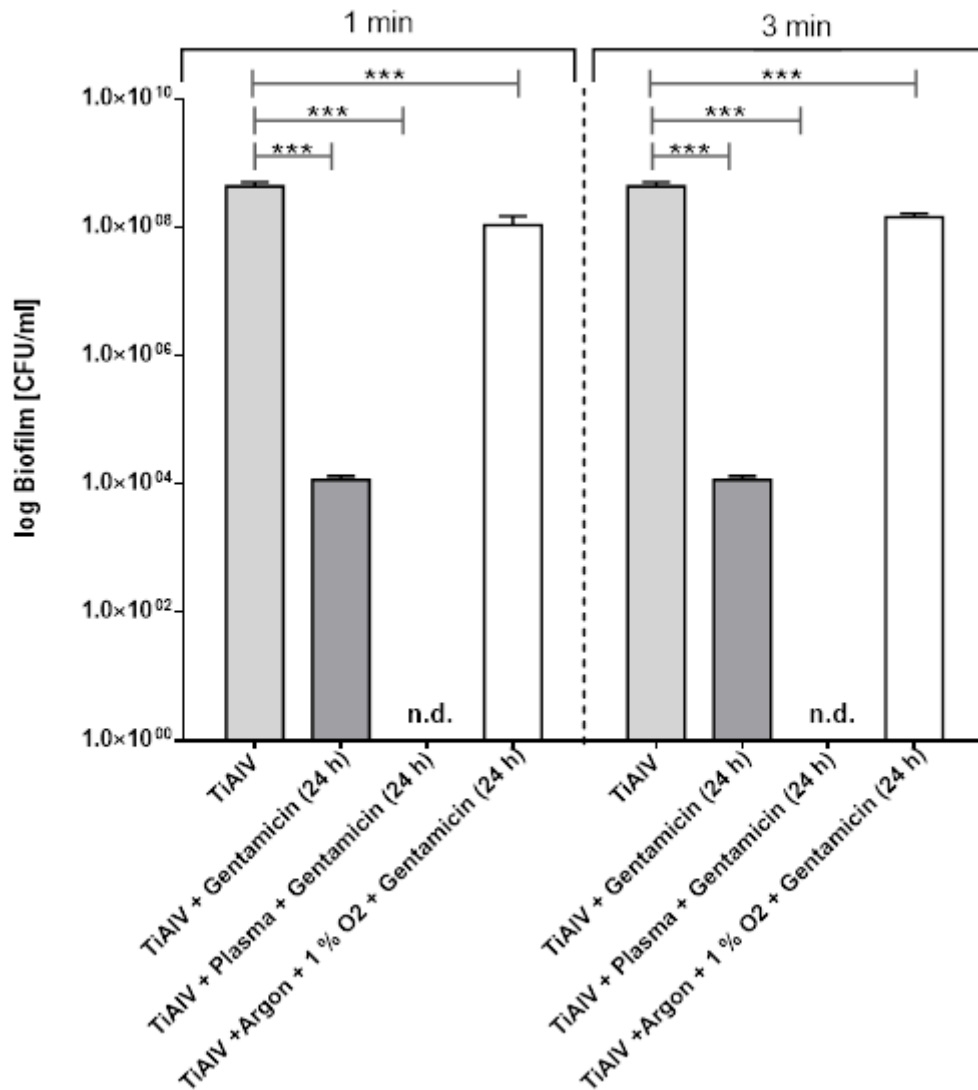


Abbildung 25: Darstellung der Lebendkeimzahlen nach Revitalisierung. Inkubation in TSB-Medium und GM-Sulfat für 24 h (Mittelwert log KBE/ml \pm s.e.m.) von *S. epidermidis* im Biofilm nach einer bzw. drei Minuten Plasma-bzw. Gasgemisch-Exposition und anschließender Inkubation für weitere 24 h in TSB-Medium. Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (TiAlV) und der unbehandelten Kontrolle nach 24 h Inkubation in TSB-Medium und GM-Sulfat und erneuter Kultivierung in TSB-Medium. Mit n.d. sind nicht detektierbare Ergebnisse dargestellt. 2-Way ANOVA (n=6), * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

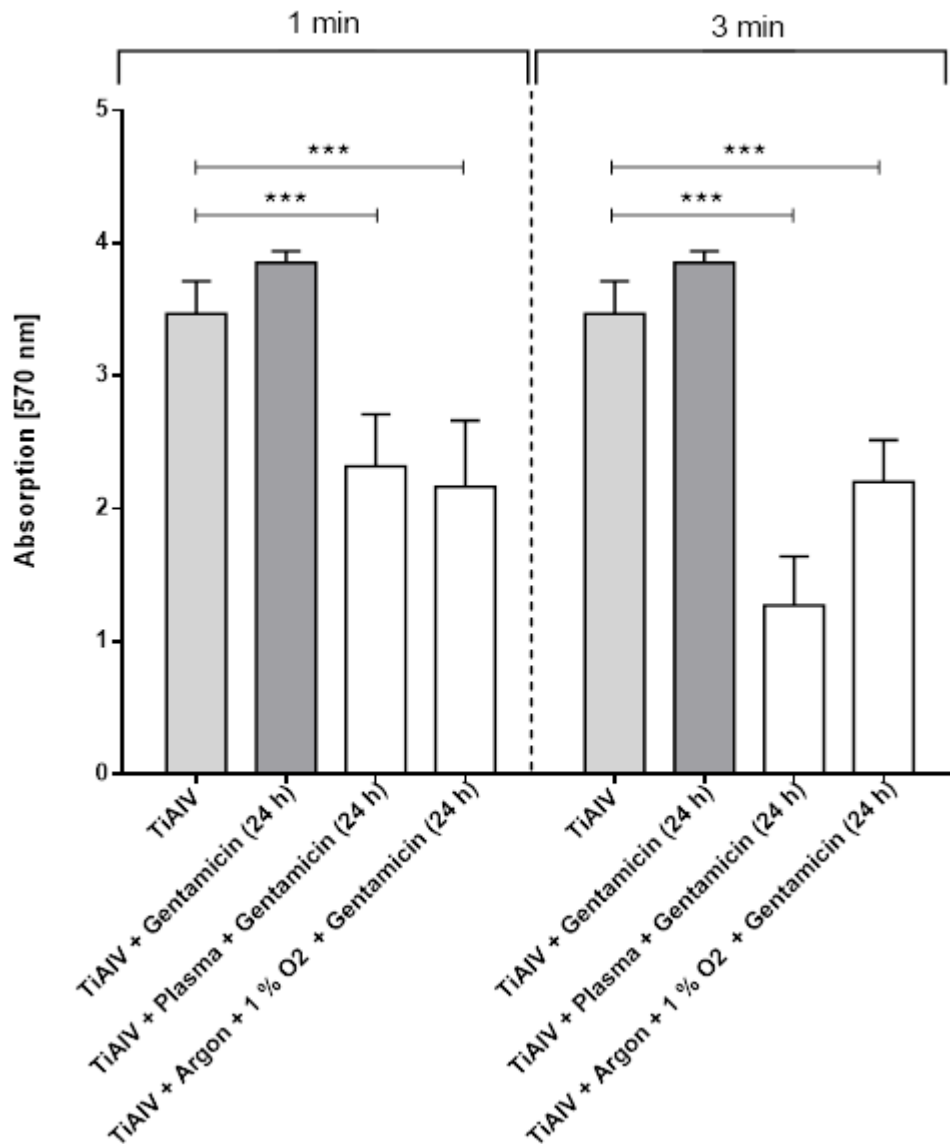


Abbildung 26: Darstellung der Biofilmmassen Quantifizierung (Absorption bei 570 nm) mittels Kristall-Violett nach Revitalisierung. Kultivierung der Biofilme in TSB-Medium und GM-Sulfat für 24 h. Biofilme von *S. epidermidis* auf TiAlV-Probekörpern nach Plasma- und Gasgemisch-Exposition für eine bzw. drei Minuten und erneuter Kultivierung in TSB-Medium. Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (TiAlV) und Kultivierung für 24 h in TSB-Medium und GM-Sulfat nach weiterer Kultivierung in TSB-Medium. Mittelwert \pm Standardabweichung. 2-Way ANOVA (n=6), * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

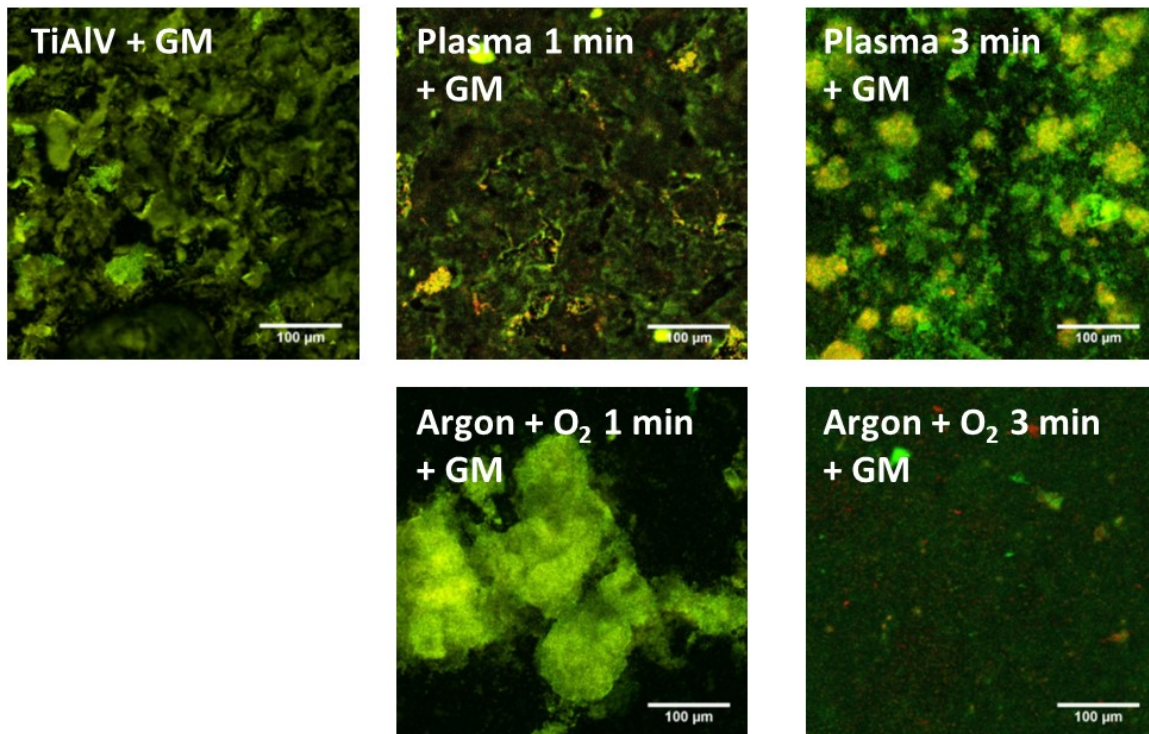


Abbildung 27: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Biofilme nach Lebend-Tot-Färbung. Plasma- bzw. Gasgemisch-Exposition und Kultivierung für 24 h in TSB-Medium und GM-Sulfat (GM) sowie erneuter Kultivierung für 24 h in TSB-Medium. Als Kontrolle sind unbehandelte Biofilme nach Kultivierung in GM-haltigem Medium und Revitalisierung dargestellt (TiAlIV + GM). Vergrößerung: 200-fach.

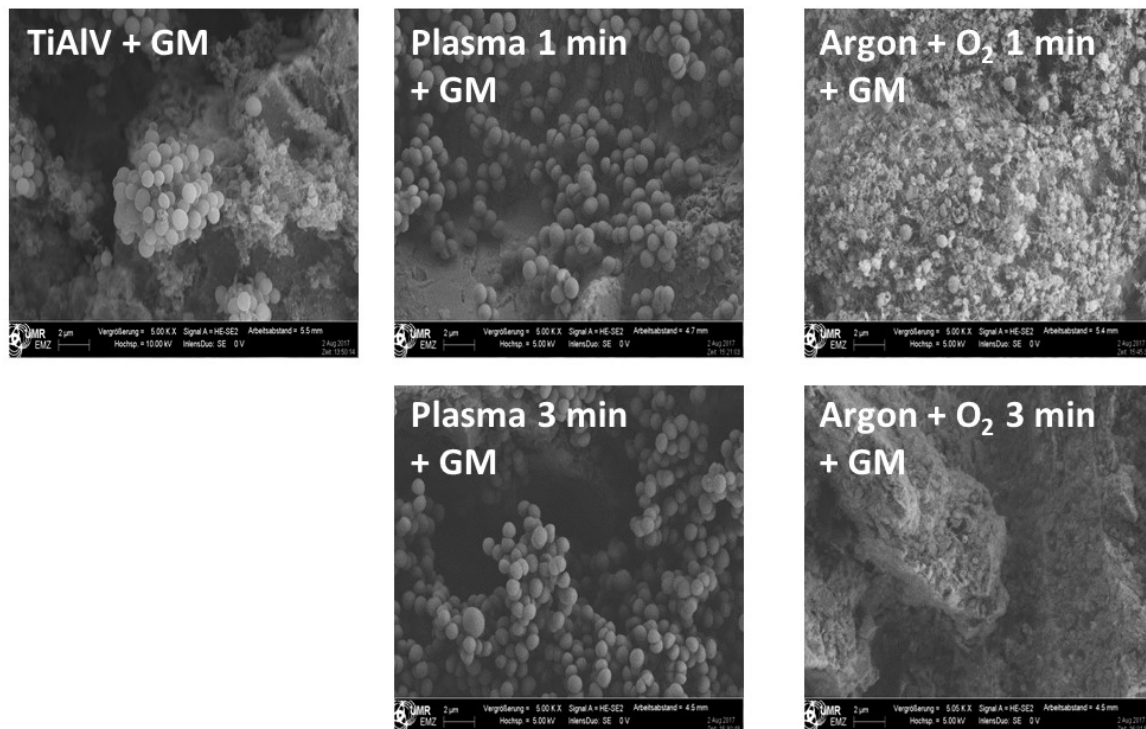


Abbildung 28: REM-Aufnahmen der Biofilm-Morphologie nach Plasma- bzw. Gas-Exposition für eine bzw. drei Minuten und Kultivierung in TSB-Medium und GM-Sulfat für 24 h mit anschließender Revitalisierung. Vergrößerung: 5000-fach.

3.2.4 Untersuchung der Empfindlichkeit von *S. epidermidis* nach Plasma-Behandlung gegenüber ausgewählten Antibiotika im planktonischen Zustand

Anhand des angefertigten Antibiotogramms von *S. epidermidis* RP62A konnte gezeigt werden, dass *S. epidermidis* gegen weitere Antibiotika als Gentamicin resistent ist. Um zu untersuchen, ob die Effekte der Plasma-bzw. Gas-Exposition auch für weitere Antibiotika bestehen, wurden neben Gentamicin zusätzlich noch Erythromycin sowie Ampicillin untersucht. Weiterhin sollten Effekte dieser Antibiotika auf planktonische Bakterien nach der Plasma-bzw. Gas-Exposition untersucht werden, um den Zustand sich ablösender einzelner Bakterien bzw. Mikrokolonien aus dem Biofilm zu simulieren. Wie Gentamicin wirkt auch Erythromycin auf die Proteinbiosynthese der Bakterien ein, indem es an die 50S-Untereinheiten der bakteriellen Ribosomen bindet. Ampicillin hingegen gehört zur Gruppe der β -Laktam Antibiotika und hemmt das bakterielle Wachstum indem es durch Blockieren der Transpeptidase nach der Teilung der Bakterien die Neusynthese der Zellwand verhindert. Sowohl Gentamicin, als auch Erythromycin und Ampicillin wirken, abhängig von ihrer Konzentration, bakterizid. Zur Untersuchung verstärkender oder gar vermindernder Effekte von Plasma bzw. dem Argon-Sauerstoff-Gemisch auf die bakterizide Wirkung der einzelnen Antibiotika, wurden Wachstumskinetiken mit unterschiedlichen Konzentrationen der einzelnen Antibiotika angefertigt. Um den Bereich der relevanten Konzentrationen einschätzen zu können, wurden zunächst die MHK der beiden übrigen Antibiotika bestimmt. Dazu wurden die Bakterien wie unter Abschnitt 2.7.1 beschrieben mittels Ultraschall-Behandlung nach Plasma-bzw. Gas-Exposition von den Probekörpern gelöst. Zur Untersuchung der MHK wurden die OD₆₀₀ der unterschiedlichen Suspensionen anhand der Probe mit der geringsten optischen Dichte verdünnt, um normierte Ergebnisse zu erhalten.

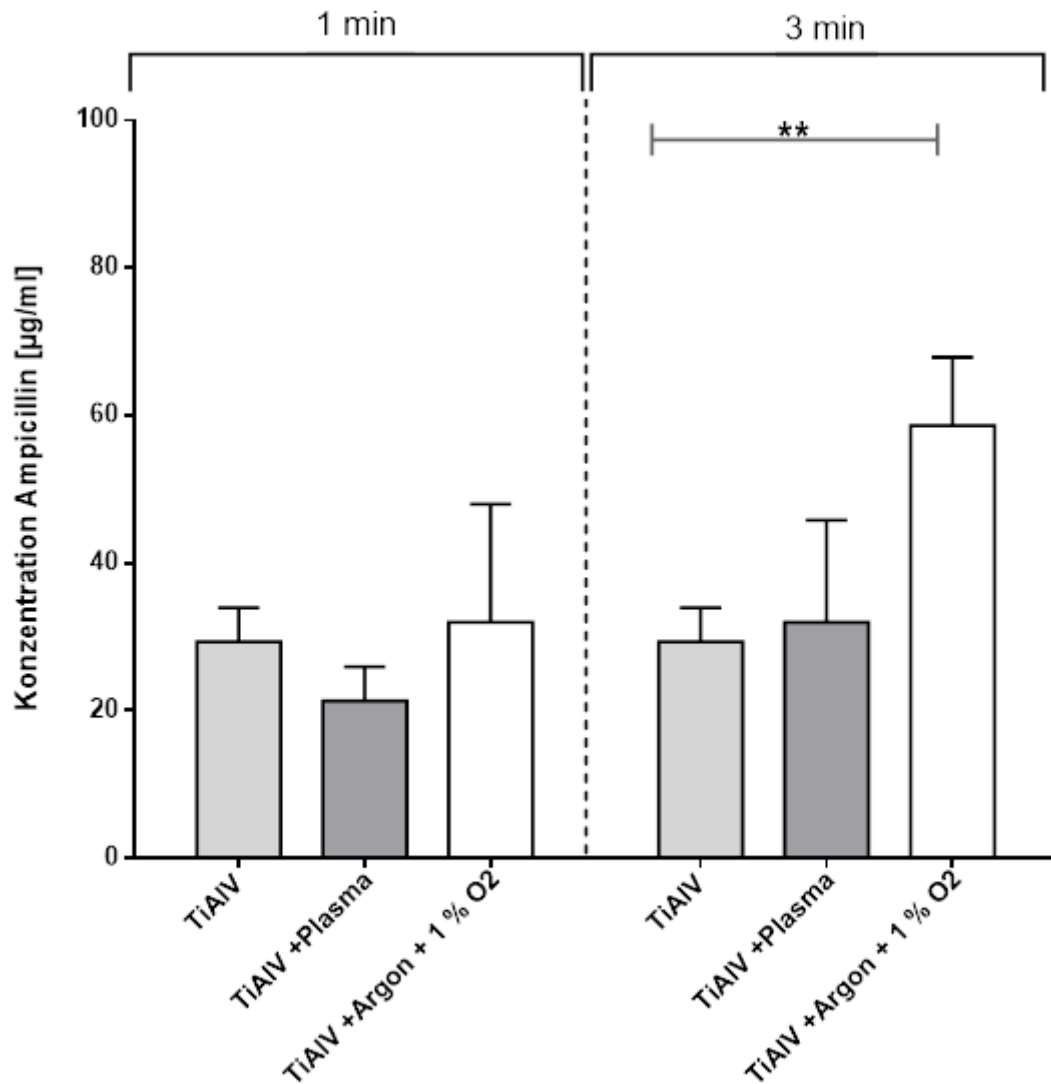


Abbildung 29: MHK-Bestimmung von Ampicillin gegen *S. epidermidis* RP62A (Mittelwert \pm Standardabweichung Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]). MHK nach Plasma-bzw. Gas-Exposition im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (TiAlV). 2-Way ANOVA ($n \geq 3$), * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

In Abbildung 29 sind die Ergebnisse der MHK-Bestimmung von Ampicillin gegen *S. epidermidis* RP62A nach Plasma-bzw. Gas-Exposition dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass durch das längere Wirken von Plasma, aber auch des Gasgemisches, eine höhere Konzentration Ampicillin benötigt wird, als bei der unbehandelten Kontrolle, um das Wachstum von *S. epidermidis* zu hemmen.

Für Erythromycin konnten zur MHK keine quantitativen Daten erhoben werden, da die MHK außerhalb des Konzentrationsbereichs der kommerziellen E-Test-Streifen lag.

Nach der Bestimmung der MHK für Ampicillin und Erythromycin wurden Wachstumskinetiken der Plasma-bzw. Gas-behandelten Biofilme nach deren Ablösung von der Oberfläche der Probekörper angefertigt. Da die minimalen bakteriziden Konzentrationen für Erythromycin zu

hoch waren bzw. nicht bestimmt werden konnten, wurden die Wachstumskinetiken mit Konzentrationen für alle Antibiotika im Bereich von 1 µg/ml bis 1000 µg/ml durchgeführt.

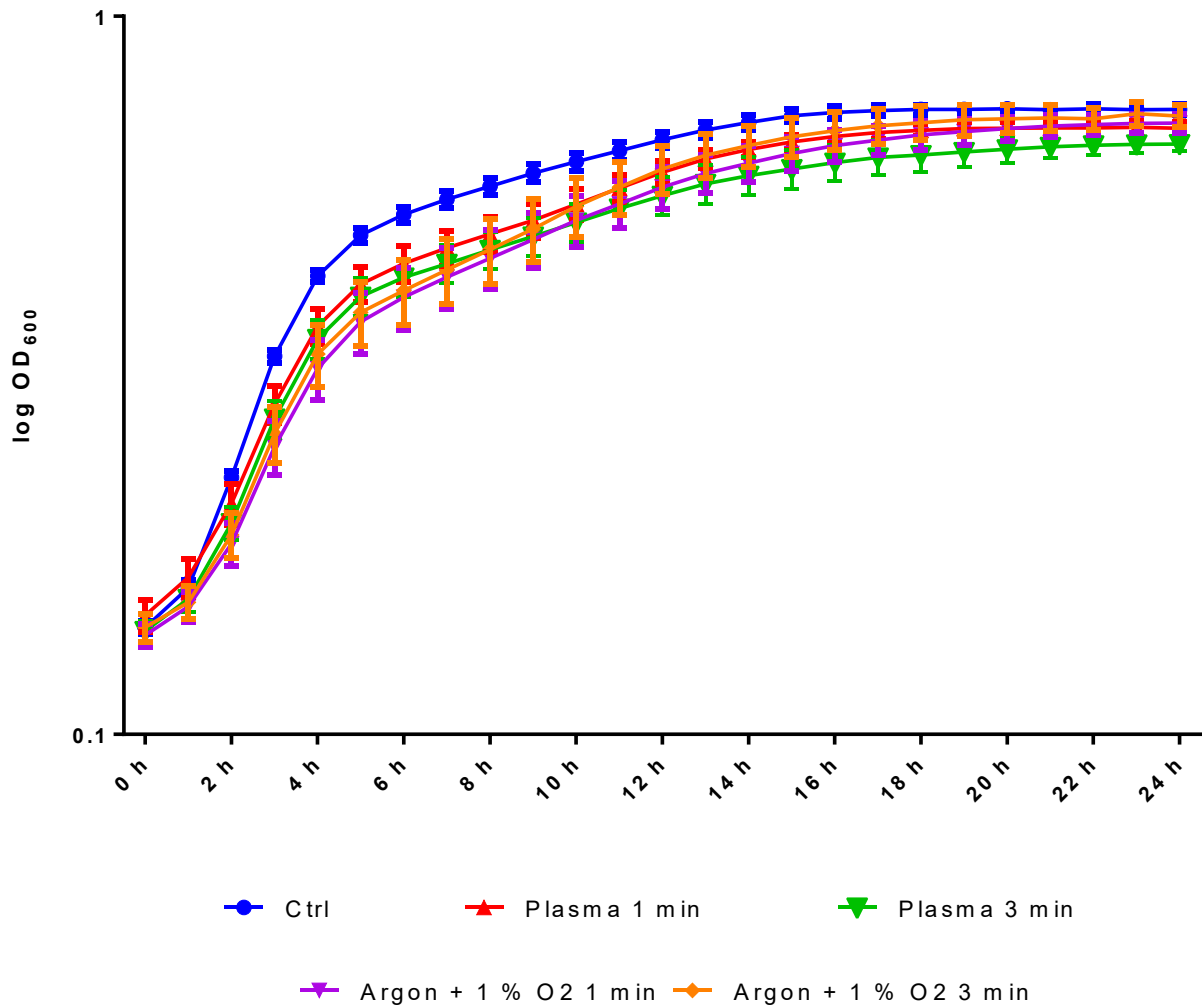


Abbildung 30: Wachstumskinetik von *S. epidermidis* aus den Biofilmen nach Plasma-bzw. Gas-Exposition über 24 h. Messung der optischen Dichte bei 600 nm. Logarithmische Zusammenstellung der Absorptionen. Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (TiAlV). Mittelwert \pm Standardabweichung. $n \geq 6$.

Zunächst wurde das Wachstum der Plasma-bzw. Gas-behandelten Bakterien aus den Biofilmen ohne Antibiose untersucht. In Abbildung 30 sind die optischen Dichten bei 600 nm über einen Zeitraum von 24 h dargestellt. So zeigt *S. epidermidis* sowohl nach Plasma-, als auch nach Gas-Exposition ein ähnliches Wachstumsverhalten wie auch die unbehandelte Kontrolle auf. Nach einer kurzen lag-Phase weisen alle Bakterien ein exponentielles Wachstum zwischen 2 h und 6 h mit einer anschließenden stationären Wachstumsphase auf.

Tabelle 9: Darstellung der Wachstumsraten [h^{-1}] und Verdopplungszeiten [h] von *S. epidermidis* nach Plasma-bzw. Gas-Exposition im Biofilm. Mittelwert \pm Standardabweichung. $n \geq 6$.

	TiAlV	Plasma 1 min	Plasma 3 min	Argon + 1 % O_2 1 min	Argon + 1 % O_2 3 min
Wachstumsrate μ [h^{-1}]	2,00 \pm 0,28	2,06 \pm 0,43	2,05 \pm 0,33	2,26 \pm 0,42	2,24 \pm 0,30
Verdopplungszeit t_d [h]	0,35 \pm 0,05	0,36 \pm 0,15	0,35 \pm 0,05	0,32 \pm 0,06	0,32 \pm 0,05

Die in Tabelle 9 dargestellten Wachstumsraten und Verdopplungszeiten bestätigen das Ergebnis. Lediglich die Gas-exponierten Bakterien weisen ein geringfügig schnelleres Wachstum auf.

Anhand von Abbildung 47 (siehe Anhang) ist zu erkennen, dass das Wachstumsverhalten von *S. epidermidis* nach Plasma-bzw. Gas-Behandlung unter Einwirkung von Gentamicin verlangsamt ist. So zeigen die mit Plasma behandelten Bakterien zwar einen ähnlichen Wachstumsverlauf wie die unbehandelte Kontrolle auf, allerdings mit einer geringeren optischen Dichte [600 nm]. Die dem Gasmisch exponierten Bakterien innerhalb der Biofilme weisen eine deutliche Abweichung in ihrem Wachstumsverhalten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf. Es fällt auf, dass die lag-Phase bis zu 5 h länger andauert, als bei der Kontrolle oder den Plasma behandelten Bakterien, sodass die exponentielle Phase verzögert ab Stunde 6 eintritt. Die Länge der exponentiellen Wachstumsphase ist dann allerdings wieder identisch. Für das Wachstumsverhalten unter Einfluss der Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ Erythromycin bzw. Ampicillin sind keine größeren Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu beobachten (siehe Tabelle 10, Tabelle 12 und Tabelle 14).

Tabelle 10: Darstellung der Wachstumsraten [h^{-1}] von *S. epidermidis* nach Plasma-bzw. Gas-Exposition im Biofilm unter Einfluss von je 1 $\mu\text{g/ml}$ bis 1000 $\mu\text{g/ml}$ Gentamicin. Mittelwert \pm Standardabweichung. $n \geq 6$.

Wachstumsrate μ [h^{-1}]	TiAlV	Plasma 1 min	Plasma 3 min	Argon + 1 % O_2 1 min	Argon + 1 % O_2 3 min
Gentamicin [1 $\mu\text{g/ml}$]	2,67 \pm 0,20	1,92 \pm 0,43	2,37 \pm 0,77	0,14 \pm 0,04	0,19 \pm 0,05
Gentamicin [100 $\mu\text{g/ml}$]	0,77 \pm 0,35	0,46 \pm 0,54	0,15 \pm 0,05	0	0,22 \pm 0,05
Gentamicin [1000 $\mu\text{g/ml}$]	0,31 \pm 0,06	0,19 \pm 0,04	0,09 \pm 0,03	0	0,10 \pm 0,03

Tabelle 11: Darstellung Verdopplungszeiten [h] von *S. epidermidis* nach Plasma-bzw. Gas-Exposition im Biofilm unter Einfluss von 1 µg/ml bis 1000 µg/ml Gentamicin. Mittelwert ± Standardabweichung. n≥6.

Verdopplungszeit t_d [h]	TiAlV	Plasma 1 min	Plasma 3 min	Argon + 1 % O ₂ 1 min	Argon + 1 % O ₂ 3 min
Gentamicin [1 µg/ml]	0,26 ± 0,02	0,38 ± 0,11	0,34 ± 0,16	5,42 ± 1,58	3,34 ± 0,95
Gentamicin [100 µg/ml]	1,31 ± 0,89	2,54 ± 0,96	5,31 ± 1,34	-	3,29 ± 0,60
Gentamicin [1000 µg/ml]	2,30 ± 0,40	3,76 ± 0,85	8,67 ± 2,59	-	7,77 ± 2,32

Die in den Tabelle 10 und Tabelle 11 dargestellten Wachstumsraten bzw. Verdopplungszeiten bestätigen das Ergebnis der Wachstumskinetiken. So ist auch hier zu beobachten, dass unter Einfluss von Gentamicin und einer vorherigen Exposition der Biofilme mit dem Argon-Sauerstoff-Gemisch das Wachstum von *S. epidermidis* bis zu 6-fach verzögert wird.

Unter Einfluss von 100 µg/ml Gentamicin ist deutlich zu erkennen, dass das Wachstum von *S. epidermidis* verzögert wird. Nach einer verlängerten lag-Phase von 14 h erfolgt das exponentielle Wachstum unter Einfluss von Gentamicin erst nach 15 h (siehe Abbildung 48, Anhang). Innerhalb des Versuchszeitraums von 24 h ist keine stationäre Phase nachzuweisen. Im Vergleich zur Wachstumskinetik ohne Einfluss von Gentamicin steigt die Verdopplungszeit von 0,35 h ± 0,05 h auf 3,00 h ± 0,12 h an. Nach Plasma-Exposition für eine bzw. drei Minuten ist ein ähnlicher Verlauf zu beobachten. So ist auch hier die lag-Phase um 12 h länger als im Vergleich zur Wachstumskinetik ohne Einfluss von Gentamicin. Auch im Fall der Plasma-Exposition wird die stationäre Wachstumsphase nicht innerhalb des Versuchszeitraums von 24 h erreicht. Wie in Tabelle 11 dargestellt, steigt die Verdopplungszeit nach einer Minute Plasma-Behandlung von 0,36 h ± 0,15 h ohne Einfluss von Gentamicin auf 2,54 h ± 0,96 h. Für die Expositionszeit von drei Minuten ist sogar ein Anstieg der Verdopplungszeit von 0,35 h ± 0,05 h auf 5,31 h ± 1,34 h zu beobachten. Unter Einfluss der Gas-Exposition ist zu erkennen, dass nach einer Minute Behandlung mit dem Gasgemisch und Kultivierung mit 100 µg/ml GM-Sulfat kein Wachstum von *S. epidermidis* über den Versuchszeitraum von 24 h stattfindet. Im Gegensatz dazu ist nach Behandlung von *S. epidermidis* für drei Minuten mit dem Argon-Sauerstoff-Gemisch unter Einfluss von 100 µg/ml GM-Sulfat deutlich Wachstum nachzuweisen. So ist dieses zwar im Vergleich zur Wachstumskinetik ohne Einfluss von Gentamicin verzögert. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ist allerdings zu erkennen, dass die exponentielle Wachstumsphase von *S. epidermidis* nach Gas-Exposition acht Stunden früher einsetzt und die stationäre Wachstumsphase innerhalb des Versuchszeitraums

nach ca. 15 h erreicht ist. Die daraus resultierenden Wachstumsraten und Verdopplungszeiten (Tabelle 12, Tabelle 13) bestätigen dieses Ergebnis.

In Abbildung 49 (siehe Anhang) ist das Wachstumsverhalten von *S. epidermidis* unter Einfluss von 1000 µg/ml Gentamicin, Erythromycin bzw. Ampicillin dargestellt. Unter Einfluss von 1000 µg/ml Gentamicin ist deutlich eine Wachstumshemmung über den Versuchszeitraum von 24 h zu beobachten. Lediglich nach der dreiminütigen Exposition mit dem Argon-Sauerstoff-Gemisch konnte ein verzögertes Wachstum nachgewiesen werden.

Tabelle 12: Darstellung der Wachstumsraten [h^{-1}] von *S. epidermidis* nach Plasma-bzw. Gas-Exposition im Biofilm unter Einfluss von je 1 µg/ml bis 1000 µg/ml Erythromycin. Mittelwert \pm Standardabweichung. $n \geq 6$.

Wachstumsrate μ [h^{-1}]	TiAIV	Plasma 1 min	Plasma 3 min	Argon + 1 % O_2 1 min	Argon + 1 % O_2 3 min
Erythromycin [1 µg/ml]	$2,19 \pm 0,11$	$2,49 \pm 0,48$	$2,33 \pm 0,59$	$2,14 \pm 0,36$	$2,25 \pm 0,22$
Erythromycin [100 µg/ml]	$3,00 \pm 0,12$	$2,51 \pm 0,44$	$2,18 \pm 0,37$	$2,07 \pm 0,20$	$2,31 \pm 0,26$
Erythromycin [1000 µg/ml]	$3,44 \pm 0,07$	$2,51 \pm 0,36$	$2,33 \pm 0,28$	$2,53 \pm 0,30$	$2,53 \pm 0,25$

Tabelle 13: Darstellung Verdopplungszeiten [h] von *S. epidermidis* nach Plasma-bzw. Gas-Exposition im Biofilm unter Einfluss von 1 µg/ml bis 1000 µg/ml Erythromycin. Mittelwert \pm Standardabweichung. $n \geq 6$.

Verdopplungszeit t_d [h]	TiAIV	Plasma 1 min	Plasma 3 min	Argon + 1 % O_2 1 min	Argon + 1 % O_2 3 min
Erythromycin [1 µg/ml]	$0,32 \pm 0,02$	$0,29 \pm 0,05$	$0,31 \pm 0,06$	$0,33 \pm 0,06$	$0,31 \pm 0,03$
Erythromycin [100 µg/ml]	$0,23 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,04$	$0,33 \pm 0,06$	$0,34 \pm 0,03$	$0,30 \pm 0,03$
Erythromycin [1000 µg/ml]	$0,20 \pm 0,00$	$0,28 \pm 0,04$	$0,30 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,03$

Unter Einfluss von 100 µg/ml Erythromycin ist kein signifikanter Unterschied im Wachstum zur Kontrolle ohne Erythromycin zu beobachten (siehe Tabelle 12 und Tabelle 13). Auch nach Plasma-bzw. Gas-Exposition ist das Wachstumsverhalten von *S. epidermidis* gleich bleibend.

Ein Wachstumshemmender Einfluss von 1000 µg/ml Erythromycin auf *S. epidermidis* konnte nicht nachgewiesen werden. Lediglich unter Einfluss von Plasma und dem Argon-Sauerstoffgemisch wurden leicht erhöhte Verdopplungszeiten von bis zu 0,1 h beobachtet.

Tabelle 14: Darstellung der Wachstumsraten [h^{-1}] von *S. epidermidis* nach Plasma-bzw. Gas-Exposition im Biofilm unter Einfluss von je 1 µg/ml bis 1000 µg/ml Ampicillin. Mittelwert \pm Standardabweichung. $n \geq 6$.

Wachstumsrate μ [h^{-1}]	TiAIV	Plasma 1 min	Plasma 3 min	Argon + 1 % O_2 1 min	Argon + 1 % O_2 3 min
Ampicillin [1 µg/ml]	2,69 \pm 0,45	2,22 \pm 0,17	2,23 \pm 0,16	2,80 \pm 0,59	2,43 \pm 0,25
Ampicillin [100 µg/ml]	0,62 \pm 0,41	2,32 \pm 0,49	2,04 \pm 0,58	2,13 \pm 0,49	1,40 \pm 0,55
Ampicillin [1000 µg/ml]	0	0	0	0	0

Tabelle 15: Darstellung Verdopplungszeiten [h] von *S. epidermidis* nach Plasma-bzw. Gas-Exposition im Biofilm unter Einfluss von 1 µg/ml bis 1000 µg/ml Ampicillin. Mittelwert \pm Standardabweichung. $n \geq 6$.

Verdopplungszeit t_d [h]	TiAIV	Plasma 1 min	Plasma 3 min	Argon + 1 % O_2 1 min	Argon + 1 % O_2 3 min
Ampicillin [1 µg/ml]	0,27 \pm 0,05	0,31 \pm 0,03	0,31 \pm 0,02	0,26 \pm 0,05	0,29 \pm 0,03
Ampicillin [100 µg/ml]	2,26 \pm 1,43	0,32 \pm 0,08	0,38 \pm 0,11	0,35 \pm 0,08	0,60 \pm 0,25
Ampicillin [1000 µg/ml]	-	-	-	-	-

Anhand der Wachstumskinetik von *S. epidermidis* unter Wirkung von 100 µg/ml Ampicillin ist lediglich für die unbehandelte Kontrolle ein Wachstumshemmender Effekt durch Ampicillin zu beobachten. So ist die Verdopplungszeit für die unbehandelte Kontrolle um bis zu 7-fach höher, als für das Wachstum von *S. epidermidis* nach Plasma-bzw. Gas-Exposition. Passend zur MHK-Bestimmung wird auch an dieser Stelle deutlich, dass nach Plasma-bzw. Gas-Exposition eine höhere Konzentration von Ampicillin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle benötigt wird, um das Wachstum von *S. epidermidis* zu behindern. Ab einer Konzentration von 1000 µg/ml zeigt Ampicillin allerdings eine Wachstumshemmung von *S. epidermidis* sowohl ohne als auch unter Einfluss von Plasma-bzw. dem Argon-Sauerstoffgemisch (Tabelle 14 und Tabelle 15).

3.2.5 Untersuchung zur Resistenz von *S. epidermidis* RP6A gegenüber kaltem Atmosphärendruckplasma

Um eine mögliche Resistenzentwicklung von *S. epidermidis* nach Plasma-bzw. Gas-Exposition zu untersuchen, wurde ein modifiziertes Agar-Platten basiertes System nach Mai-Prochnow et al. 2015 angewendet. Dazu wurden *S. epidermidis* in einer Konzentration von 10^8 KBE/ml auf TSB-Agar ausplattiert und für eine bzw. drei Minuten mit Plasma punktuell behandelt. Als Kontrolle dienten Agar-Platten, die mit dem Argon-Sauerstoff-Gemisch behandelt wurden. Die Agar-Platten wurden dann für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Entstandene Hemmhöfe wurden mit Hilfe eines Lineals vermessen. Größere Hemmhöfe entsprachen dabei einer größeren Sensitivität von *S. epidermidis* gegenüber der Plasma-oder Gas-Behandlung. Kleinere Hemmhöfe wiesen hingegen auf eine Unempfindlichkeit gegenüber der Plasma-oder Gas-Exposition hin. Wurde innerhalb der Hemmhöfe Koloniewachstum festgestellt, wurden diese isoliert und erneute auf TSB-Agar ausplattiert. Weiterhin wurde das Wachstum dieser Kolonien unter oxidativen Stress mittels unterschiedlicher Konzentrationen H₂O₂ (0 %, 3 % und 10 %) untersucht. Nach erneuter Plasma-bzw. Gas-Behandlung der Bakteriensuspensionen auf TSB-Agar, wurden auch diese wieder für 24 h kultiviert und anschließend entstandene Hemmhöfe quantifiziert. Anhand der Hemmhof-Durchmesser konnten auch hier Rückschlüsse auf die Sensitivität von *S. epidermidis* gegenüber Plasma bzw. dem Argon-Sauerstoff-Gemisch getroffen werden. Das Wachstum überlebender Kolonien innerhalb der Hemmhöfe wurden wie oben beschrieben unter oxidativem Stress untersucht. In Abbildung 31 sind die Ergebnisse der Quantifizierung der Hemmhof-Durchmesser dargestellt.

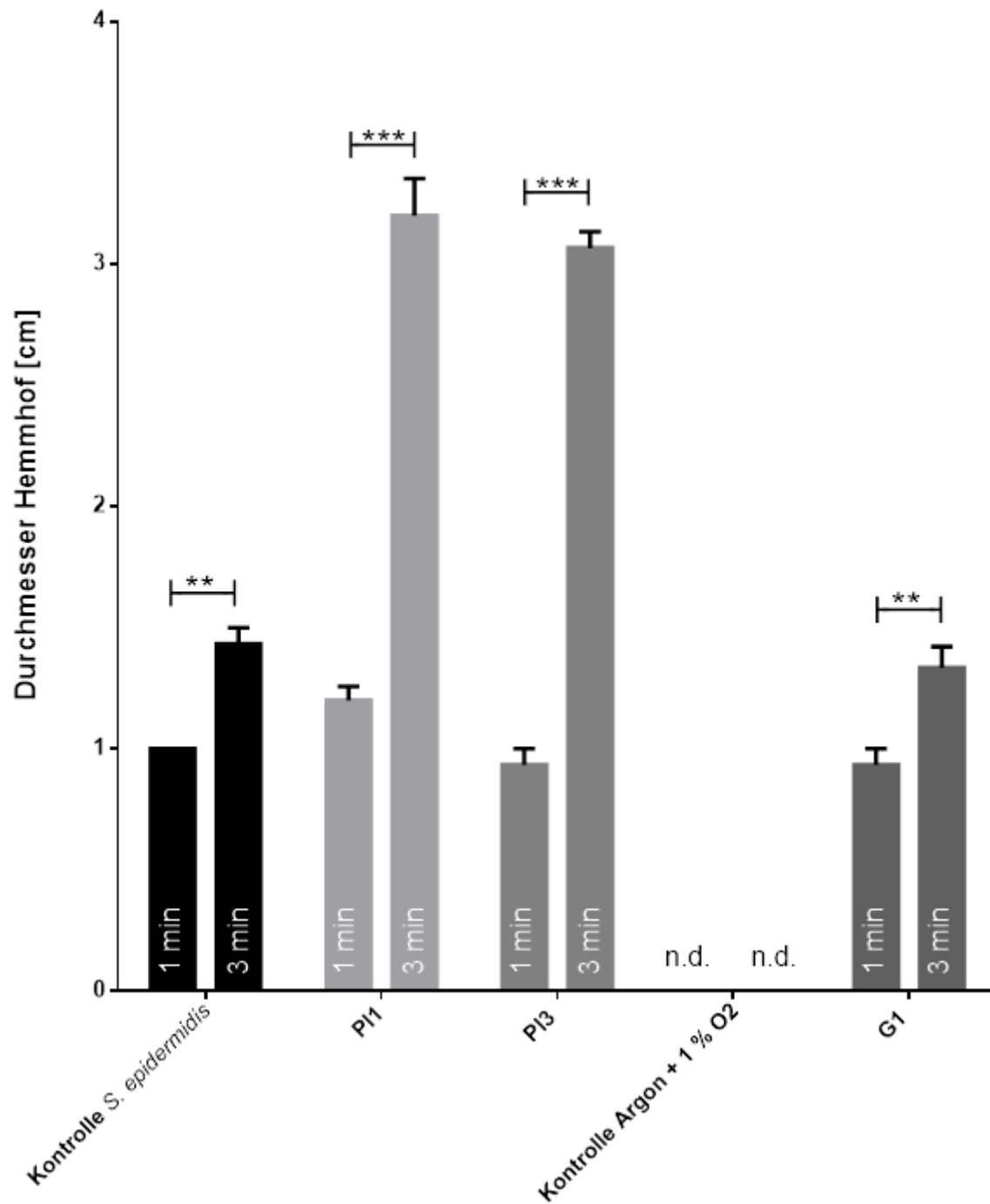


Abbildung 31: Plasma-Resistenz-Test. Quantifizierung der Hemmhof-Durchmesser (Mittelwert \pm Standardabweichung [cm]) des Agar-Platten basierten Plasma-Resistenz-Test nach einer bzw. drei Minuten Plasma-Exposition. Kontrolle *S. epidermidis* bezeichnet den Hemmhof-Durchmesser nach der ersten Plasma-Exposition für eine bzw. drei Minuten. PI1 1 min bzw. PI1 3 min beschreibt die Hemmhöfe der überlebenden Kolonien aus den Hemmhöfen von Kontrolle *S. epidermidis* nach Plasma-Exposition für eine bzw. drei Minuten. Kontrolle Argon + 1 % O₂ bezeichnet die Hemmhöfe nach Gas-Exposition für eine bzw. drei Minuten. G1 1 min und G1 3 min beschreibt die Durchmesser der Hemmhöfe der lebenden Kolonien nach Gas-Exposition für eine bzw. drei Minuten. Mit n.d. sind nicht detektierbare Ergebnisse dargestellt. 2-Way ANOVA (n=3), * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Die Kontrolle *S. epidermidis* weist eindeutig darauf hin, dass eine längere Plasma-Expositionszeit zu einem größeren Hemmhof führt und damit zu einer höheren, Behandlungszeit-abhängigen Sensitivität von *S. epidermidis* gegenüber der Plasma-Behandlung. Die überlebenden Kolonien innerhalb der Hemmhöfe wurden wie oben beschrieben erneut mit Plasma für eine bzw. drei Minuten behandelt (PI1 1 min, PI1 3 min sowie PI3 1 min und PI3 3 min). Auch hier ist eine signifikante Zeit-abhängige Zunahme der Sensitivität gegenüber der Plasma-Exposition anhand der vergrößerten Hemmhöfe zu erkennen. Die Bakterien-suspensionen auf den Agar-Platten, die jeweils drei Minuten erneut mit Plasma behandelt wurden zeigen dabei eine signifikante Vergrößerung der Hemmhöfe um $1,77 \text{ cm} \pm 0,12 \text{ cm}$ (PI1 3 min) bzw. um $1,63 \text{ cm} \pm 0,09 \text{ cm}$ (PI3 3 min) im Vergleich zur Kontrolle (Kontrolle *S. epidermidis* 3 min). Nach der Gas-Exposition der Bakterien-suspensionen auf TSB-Agar konnten keine Hemmhöfe nachgewiesen werden (n. d.). Nichtsdestotrotz wurden Kolonien auf den Gas-behandelten Agar-Platten isoliert und erneut mit dem Gasgemisch behandelt. Es ist deutlich zu erkennen, dass eine erneute Gas-Exposition zu einer signifikanten Vergrößerung der Hemmhöfe führt und somit zu einer Steigerung der Empfindlichkeit von *S. epidermidis* gegenüber dem Gasgemisch. Auch hier führt eine längere Behandlungszeit zu einer Zunahme der Sensitivität gegenüber dem Argon-Sauerstoff-Gemisch.

Die isolierten Kolonien aus den entstandenen Hemmhöfen wurden anschließend auf ihre Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress untersucht, da eine längerfristig gesteigerte Resistenz gegenüber Plasma zu einer besseren Verträglichkeit gegenüber reaktiver Sauerstoff-Spezies führen würde. Als Sauerstoff-Spezies wurde für diese Versuche H_2O_2 in unterschiedlichen Konzentrationen (0 %, 3 % und 10 %) in TSB-Medium gewählt. Die isolierten Kolonien wurden für den Versuchsansatz in Vorkulturen bis zu ihrem stationären Wachstum kultiviert und anschließend auf eine Bakterienkonzentration von 10^8 KBE/ml anhand ihrer spezifischen optischen Dichte bei 600 nm eingestellt. Für die Wachstumskinetiken wurden die Suspensionen dann 1:10 in TSB-Medium mit den unterschiedlichen H_2O_2 -Konzentrationen verdünnt und für 24 h bei 37 °C kultiviert und stündlich die optische Dichte bei 600 nm gemessen. In Abbildung 50 (siehe Anhang) sind die Ergebnisse der Wachstumsversuche dargestellt. Ohne Einfluss von H_2O_2 auf das Wachstum von *S. epidermidis* ist kein signifikanter Unterschied im Wachstumsverhalten der einzelnen Isolate nachzuweisen. Im Vergleich dazu ist allerdings deutlich zu erkennen, dass unter Einwirkung von 3 % H_2O_2 das Wachstum der Plasma-exponierten Isolate völlig gehemmt wird. Die daraus berechneten Wachstumsraten und Verdopplungszeiten (Tabelle 16 und Tabelle 17) bestätigen das Ergebnis. Lediglich die unbehandelte Kontrolle (Kontrolle *S. epidermidis*) sowie die Isolate der Gas-Exposition scheinen unter Einfluss von 3 % H_2O_2 ein zumindest verzögertes Wachstum aufzuweisen. So steigen die Verdopplungszeiten dieser Isolate von $0,24 \text{ h} \pm 0,08 \text{ h}$ auf $0,81 \text{ h} \pm 0,10 \text{ h}$ für die unbehandelte Kontrolle und von $0,23 \text{ h} \pm 0,02 \text{ h}$ (G1) bzw. $0,35 \text{ h} \pm$

0,07 h (G1 1 min) auf $0,68 \text{ h} \pm 0,10 \text{ h}$ bzw. $0,75 \pm 0,05 \text{ h}$. Diese Ergebnisse korrelieren auch mit den Ergebnissen der Hemmhof-Quantifizierung, da für die Gas-behandelten Isolate nach einer Minute Expositionszeit keine erhöhte Sensitivität gegenüber dem Gasgemisch nachgewiesen wurde. Lediglich nach einer Behandlungszeit von 3 min konnte eine Erhöhung der Empfindlichkeit gegenüber dem Gasgemisch quantifiziert werden. Anhand des gehemmten Wachstums unter Einfluss von 3 % H_2O_2 konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Unter Einfluss von 10 % H_2O_2 konnte kein Wachstum von *S. epidermidis* nachgewiesen werden.

Tabelle 16: Plasma-Resistenz-Test. Darstellung der Wachstumsraten [h^{-1}] von *S. epidermidis* nach Plasma-bzw. Gas-Exposition unter Einfluss von je 0 % [w/v], 3 % [w/v] und 10 % [w/v] H_2O_2 . Mittelwert \pm Standardabweichung. $n \geq 4$.

Wachstums- rate μ [h^{-1}]	Kontrolle <i>S.</i> <i>epidermidis</i>	PI1 1 min	PI1 3 min	PI3 1 min	PI3 3 min	G1	G1 1 min	G1 3 min
0 % H_2O_2	$3,06 \pm 0,66$	$2,57 \pm 0,51$	$1,55 \pm 0,44$	$2,19 \pm 0,30$	$2,46 \pm 0,62$	$3,09 \pm 0,21$	$2,09 \pm 0,54$	$2,46 \pm 0,84$
3 % H_2O_2	$0,87 \pm 0,10$	0	0	0	0	$1,04 \pm 0,14$	$0,92 \pm 0,06$	0
10 % H_2O_2	$0,91 \pm 0,32$	0	0	0	0	$1,52 \pm 0,51$	0	0

Tabelle 17: Plasma-Resistenz-Test. Darstellung der Verdopplungszeit [h] von *S. epidermidis* nach Plasma-bzw. Gas-Exposition unter Einfluss von je 0 % [w/v], 3 % [w/v] und 10 % [w/v] H_2O_2 . Mittelwert \pm Standardabweichung. $n \geq 4$.

Verdopp- lungszeit t_d [h]	Kontrolle <i>S.</i> <i>epidermidis</i>	PI1 1 min	PI1 3 min	PI3 1 min	PI3 3 min	G1	G1 1 min	G1 3 min
0 % H_2O_2	$0,24 \pm 0,08$	$0,28 \pm 0,05$	$0,49 \pm 0,15$	$0,32 \pm 0,05$	$0,30 \pm 0,07$	$0,23 \pm 0,02$	$0,35 \pm 0,07$	$0,31 \pm 0,08$
3 % H_2O_2	$0,81 \pm 0,10$	-	-	-	-	$0,68 \pm 0,10$	$0,75 \pm 0,05$	-
10 % H_2O_2	$0,95 \pm 0,53$	-	-	-	-	$0,50 \pm 0,14$	-	-

4 Diskussion

Sterile Implantat-Oberflächen sind entscheidend für einen erfolgreichen Heilungsprozess in der orthopädischen Chirurgie. Von mehreren Arbeitsgruppen konnte nachgewiesen werden, dass kaltes Atmosphärendruckplasma eine ausgeprägte antimikrobielle Wirkung auf bakterielle Biofilme besitzt (Laroussi und Leipold 2004; Gaunt et al. 2006; Lee et al. 2006; Sladek et al. 2007; Hong et al. 2009).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zunächst verschiedene Plasma-Quellen hinsichtlich ihres antimikrobiellen Potentials gegen Biofilme von *S. epidermidis* RP62A miteinander verglichen. Anhand einer ausgewählten Plasma-Quelle wurde das antimikrobielle Potential gegen Biofilme von *S. epidermidis* auf relevanten TiAlV-Probeoberflächen sowie deren Revitalisierung nach Plasma-Exposition untersucht. Die Untersuchungen umfassten weiterhin die Analyse der Empfindlichkeit der oben genannten Biofilme gegenüber ausgewählten Antibiotika nach Plasma-Behandlung sowie der potentiellen gesteigerten Unempfindlichkeit gegenüber Plasma.

4.1 Charakterisierung verschiedener Plasma-Quellen hinsichtlich ihres antimikrobiellen Potentials

Um eine geeignete Plasma-Quelle sowie eine Methode für die Behandlung stabiler, dreidimensionaler Biofilme von *S. epidermidis* zu finden, wurden zunächst insgesamt fünf verschiedene direkte (DBD) bzw. indirekte (kINPen-Geräte) Plasma-Quellen am Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie (INP, Greifswald) hinsichtlich ihres antimikrobiellen Potentials miteinander verglichen. Alle fünf verwendeten Plasma-Quellen generieren kalte Plasmen unter Atmosphärendruck und eignen sich damit für die Behandlung biologischer Materialien.

Die Biofilme von *S. epidermidis* RP62A wurden zunächst für sieben Tage auf Polystyrol-Deckgläschen kultiviert und anschließend in 1x PBS für eine bzw. drei Minuten mit den entsprechenden Plasma-Quellen zentral behandelt. Die Kultivierung auf TCPS-Oberflächen wurde gewählt, da aus der Literatur hinreichend bekannt ist, dass *S. epidermidis* besonders stabile Biofilme auf Polymeroberflächen ausbildet und Polymere übliche Werkstoffe für Implantat-Komponenten in der orthopädischen Chirurgie darstellen (Heilmann et al. 1997; Vacheethasane et al. 1998; Tormo et al. 2005a; Tormo et al. 2005b). Wasch-Schritte nach der Plasma-Behandlung dienten der Nachahmung von Spülungen während chirurgischer Prozesse. Die initialen Behandlungszeiten wurden zwischen einer und fünf Minuten auf Basis einer Studie von Montie et al. 2000 gewählt, die eine 90%ige Reduktion der vitalen Bakterien nach 20 s bis 10 min zeigte (Montie et al. 2000).

Anhand der Untersuchungsergebnisse ist zu erkennen, dass insbesondere der kHz-Jet und der kINPen08 signifikant antimikrobielles Potential besitzen. So konnte nach der Quantifizierung der Lebendkeimzahl gezeigt werden, dass bereits eine Minute nach Behandlung mit dem kHz-Jet bzw. dem kINPen08 die Vitalität der Biofilmgebundenen *S. epidermidis* um 90.84 % (s.e.m. \pm 0.9 %, $P < 0.05$) bzw. 97.34 % (s.e.m. \pm 0.4 %, $P < 0.005$) reduziert wurde. Längere Behandlungen der Biofilme mit dem kHz-Jet oder dem kINPen08 führten zu keiner weiteren signifikanten Reduktion der Vitalität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Diese bi-phasische Reduktion der Vitalität durch längere Expositionszeiten wurde auch schon von anderen Arbeitsgruppen beobachtet. Bayliss und Kollegen untersuchten die Wirkung von kaltem Plasma auf *Listeria innocua*, homogen auf Filtermembranen adhärent (Bayliss et al. 2012). Sie führten den Effekt der bi-phasischen Reduktion auf einen sogenannten physikalischen „Shielding“-Effekt avitaler Bakterien zurück, wodurch vitale Bakterien durch bereits abgetötete Bakterien in Aggregaten vor der Plasma-Wirkung geschützt werden. Dieser Prozess der aktiven Selbst-Organisation von Bakterien wurde schon vielfach für heterogene mikrobielle Biofilme beschrieben (Flemming et al. 2016). So besitzen Bakterien innerhalb eines Biofilms die Möglichkeit, sich durch lokale Gegebenheiten ausgelöste Differenzierungsprozesse und koordinierte Lebens-Zyklen, wie Stadien-abhängige Gen- und Proteinexpression an diese anzupassen (Singer et al. 2010; Corning 2002). Dieser „Shielding“-Effekt wurde auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet. Die REM- Aufnahmen (Abbildung 11) lassen deutlich erkennen, dass die obersten Biofilm-Schichten nach Plasma-Exposition mit kHz Jet und kINPen08 abgetötet wurden, während darunterliegende Schichten teilweise intakt geblieben sind. Die Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nach lebend/tot-Färbung lassen grüne Fluoreszenzsignale in einzelnen Aggregaten und tieferen Schichten des Biofilms erkennen. Neben dem physikalischen Schutz entsteht durch die Aggregation der avitalen Bakterien auch eine Barriere gegen die geladenen Teilchen der kalten Plasmen, sodass die Inaktivierung der Bakterien durch die aktiven Plasma-Bestandteile wie ROS oder RONS, Ionen oder UV-Strahlung weniger effektiv ist (Keudell et al. 2010; Bayliss et al. 2012).

Weder für den kINPen09 noch den kINPenMed konnte ein antimikrobielles Potential gegen *S. epidermidis*-Biofilme nachgewiesen werden (nach ISO 22196:2011-08, Kunststoffe - Messung von antibakterieller Aktivität auf Kunststoff- und anderen porenfreien Oberflächen). Auch hier spielt der bereits beschriebene „Shielding“-Effekt, aber auch die Degradation der EPS-Matrix eine Rolle. So ist auch hier anhand der mikroskopischen Aufnahmen (siehe Abbildung 10 und Abbildung 11) deutlich zu erkennen, dass die oberste Schicht der Biofilme durch einen Ätzungsprozess nach Exposition mit den kINPen-Quellen beschädigt wurde (Keudell et al. 2010). Durch eine Beimischung von Sauerstoff wird dieser Effekt noch verstärkt.

Neben den Effekten auf die Biofilme selbst müssen auch die technischen Parameter der einzelnen Quellen verglichen werden. Da sich die verwendeten Plasma-Quellen der kINPen-Serie, der kHz-Jet sowie die DBD hinsichtlich des Mechanismus der Plasma-Zündung und ihrer elektrischen Leistung unterscheiden, ist eine Betrachtung der Quellen über die spezifische Applikation erforderlich.

Aus den Ergebnissen der Untersuchung der physikalischen Parameter sowie der antimikrobiellen Wirkung der Plasmen auf Biofilme von *S. epidermidis* geht hervor, dass lediglich die Quellen der kINPen-Reihe über ihre elektrische Leistung miteinander verglichen werden können (siehe Tabelle 5). Der kINPen08 zeigt eine deutlich stärkere Leistung gegenüber den übrigen kINPen-Quellen. Die geringere Leistung des kINPenMed sowie kINPen09 korrelieren mit den Ergebnissen der Vitalitätsuntersuchungen.

Im Vergleich zur indirekten Plasma-Behandlung der Biofilme mit den kINPen-Geräten, werden die Biofilme bei der DBD-Behandlung direkt dem Plasma exponiert, da sich dieses zwischen dem Biofilm und der Elektrode der Quelle bildet. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass die Behandlung mit der DBD zu keiner Reduktion der Vitalität der Bakterien innerhalb der Biofilme führt. Im Gegensatz zur gängigen Literatur, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Reduktion der Vitalität der Biofilme von *S. epidermidis* innerhalb einer bzw. drei Minuten Plasma-Exposition nachgewiesen werden. Joshi und Kollegen haben gezeigt, dass eine Plasma-Behandlung von Biofilmen verschiedener *S. aureus* Subspezies (MRSA95, MRSA_USA300, MRSA_USA400) mit einer DBD (120 V) zu einer zeitabhängigen vollständigen Reduktion der Vitalität der Bakterien innerhalb von 120 s führt (Joshi et al. 2011). Auch Ibis und Kollegen wiesen eine 95%ige Inaktivierung der Biofilme innerhalb von drei Minuten Behandlungszeit mit einer DBD-Quelle (31 KV, 1.5 kHz) nach (Ibis et al. 2016). Im Unterschied zu der vorliegenden Arbeit wurde dieses Ergebnis allerdings Biofilmen auf metallischen Oberflächen (304 SS, 316L SS, Ti6Al4V) erzielt. Als Kontrolle dienten Biofilme auf UHMW-PE-Oberflächen (Ultra-High-Molecular-Weight Polyethylene). Die Vitalität dieser Biofilme wurde allerdings lediglich um eine Zehnerpotenz reduziert. Die geringere antimikrobielle Aktivität der Plasma-Behandlung an den Polyethylen-Oberflächen ist auf das generelle Prinzip der DBD-Quelle und die dielektrischen Eigenschaften des Polyethylens zurückzuführen. So ist die DBD-Plasmaentladung von verschiedenen Faktoren abhängig, einschließlich der Art und Materialstärke des Dielektrikums (Thomas et al. 2009). Die gesamte übertragene Ladung für die Plasma-Entladung ist dabei proportional zur relativen Leitfähigkeit (Dielektrizitätskonstanten) und zur Dicke des dielektrischen Materials (Kogelschatz 2003). Somit müsste bei einem dickeren Dielektrikum die Schwellenspannung zur Erzeugung der Plasma-Entladung erhöht werden. Daher ist der Effekt der verringerten antimikrobiellen Aktivität des DBD-Plasmas auf die geringe elektrische Leitfähigkeit der Polyethylen-Oberflächen im Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit zurückzuführen.

Eine Anpassung der Schwellenspannung wie durch Kogelschatz 2003 vorgeschlagen, war auf Grund der Konstruktion der verwendeten Quelle nicht möglich.

Auf Grund der Oberflächen-unabhängigen Wirkung und der einfacheren Handhabbarkeit gegenüber der DBD und dem kHz-Jet wurde die kINPen-Serie für die weiterführenden Versuche der vorliegenden Arbeit gewählt. Aus der Serie wurde das Model kINPen08 gewählt, da dieser in den Vorversuchen das höchste antimikrobielle Potential aufwies.

4.2 Charakterisierung des antimikrobiellen Potentials des kINPen08 auf Biofilme von *S. epidermidis* auf TiAlV-Oberflächen

Um sich dem klinischen Zustand einer Implantat-assoziierten Infektion *in vitro* anzunähern, wurden die Biofilme von *S. epidermidis* auf Korund-gestrahlten Ti6Al4V-Oberflächen ($R_z=20\text{ }\mu\text{m}$) für einen Zeitraum von sieben Tagen kultiviert und anschließend mit Plasma behandelt. Die Biofilmbildung auf den TiAlV-Oberflächen erfolgte in Anlehnung an Patenge und Kollegen, in deren Studie die Biofilmbildung auf antimikrobiellen Oberflächen in einem statischen Kultivierungssystem untersucht wurde (Patenge et al. 2012). Dieses Kultivierungssystem ermöglicht eine schnelle und reproduzierbare Biofilm-Kultivierung und Überwachung. Um die metabolische Aktivität der Biofilme während der Biofilmbildung über den Versuchszeitraum von sieben Tagen aufrecht zu halten, wurde in der vorliegenden Arbeit das statische Kultivierungssystem durch einen kompletten Mediumwechsel nach drei Tagen Kultivierung ergänzt. Auch nicht adhärente Bakterien bzw. Mikrokolonien konnten dabei entfernt werden. Somit wurde sichergestellt, dass die Biofilme während der Plasma-Behandlung weiterhin metabolisch aktiv waren. Die Kultivierung auf mikrostrukturierten Korund gestrahlten TiAlV-Probekörpern zur Nachahmung Implantat-relevanter Oberflächen, zeigte stabile, dreidimensionalen Biofilme nach einer Kultivierungszeit von sieben Tagen. Auch Wu und Kollegen wiesen nach, dass eine Mikrostrukturierung der Titan-Oberfläche zwischen $R_z=3\text{ }\mu\text{m}$ und $R_z=44\text{ }\mu\text{m}$ zu einer optimalen Adhäsion von *S. epidermidis* sowie Stabilität des gebildeten Biofilms innerhalb des Versuchszeitraums von 24 h führte (Wu et al. 2011). Dies lässt sich mit der vergrößerten Kontaktoberfläche begründen, die den Bakterien zur Verfügung steht, da sich diese vorwiegend in konkaven Bereichen wie Vertiefungen und Mulden der Titan-Oberfläche ansiedeln (Whitehead et al. 2005).

Zur Untersuchung der antimikrobiellen Wirkung des Plasmas auf die Biofilme von *S. epidermidis* wurde die Vitalität der Biofilme nach der Plasma-Behandlung untersucht. Als Kontrollen dienten unbehandelte Biofilme sowie Biofilme, die nur dem Argon-Sauerstoff-Gemisch ausgesetzt waren. Da nicht auszuschließen war, dass der Transport zwischen Universitätsmedizin Rostock (IMIRKO) und INP Greifswald einen Einfluss auf die Vitalität hat, wurden alle Kontrollen gemeinsam mit den behandelten Proben transportiert. Die Ergebnisse

der Vitalitätsuntersuchungen zeigen, dass die Vitalität von *S. epidermidis* um zwei bis drei Zehnerpotenzen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle reduziert wurde. Auch gegenüber den Biofilmen auf TCPS-Oberflächen wurde eine weitere Steigerung der Reduktion um mehr als 2 % beobachtet. In einem weiteren Kontrollversuch wurden die Biofilme mit Argon-Sauerstoff-Gemisch (1 % O₂) ohne Plasmazündung behandelt, um alleinige Effekte des Gasgemischs auf die Vitalität der Biofilme zu erkennen. Anhand der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Vitalität der Biofilme nach der Behandlung mit dem Gasgemisch ohne Plasma um lediglich 70,45 % nach einer Minute bzw. um 70,91 % nach drei Minuten Behandlungszeit reduziert wurde (siehe Abbildung 12). Im Vergleich zur Plasma-Behandlung ist somit kein alleiniger Effekt durch das Gasgemisch zu beobachten. Ein ähnlicher Effekt konnte auch von Mai-Prochnow und Kollegen für Biofilme von *S. epidermidis* beobachtet werden. So konnte nachgewiesen werden, dass die Vitalität der Biofilme von *S. epidermidis* auf korrosionsbeständigen Stahloberflächen durch die reine Behandlung mittels Argon (3,1 slm) lediglich um eine Zehnerpotenz verringert werden konnte. Hüfner und Kollegen stellten einen ähnlichen Vergleich an *ex vivo* dentalen Biofilmen auf, in dem Biofilme jeweils für sechs bzw. zwölf Minuten mit Argon-Plasma, Argon-Plasma-Sauerstoff sowie Argon und Argon-Sauerstoff behandelt wurden (Hüfner et al. 2017). Auch hier wurde durch die alleinige Behandlung mit dem Argon-Sauerstoff-Gemisch keine signifikante Reduktion der Biofilm-Vitalität und -Masse nachgewiesen.

Da neben der Reduktion der Vitalität der Biofilme auch die Entfernung der Biofilmmasse auf der Implantat-Oberfläche eine Rolle spielt, wurden die Biofilme in der vorliegenden Arbeit nach der Plasma-Behandlung zur Quantifizierung der Biofilmmasse mittels Kristall-Violett-Färbung untersucht. Die Ergebnisse zeigen deutlich den Einfluss der Behandlung auf die Biofilmmasse. Nach Behandlung mit dem Argon-Sauerstoff Gemisch konnte eine Verminderung der Biofilmmasse um 26 % bzw. 14 % nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl für die Plasma-Behandlung, als auch für die Gas-Exposition Sauerstoff beigemischt. Fricke und Kollegen zeigten, dass eine Beimischung von 1 % Sauerstoff zum Plasma des kINPen08 die Entfernung sowie die Reduktion der Biofilme von *C. albicans* signifikant verbesserte (Fricke et al. 2012). Anhand optischer Emissionsspektroskopie wiesen sie nach, dass vor allem Bestandteile des Plasmas wie atomarer Sauerstoff oder freie Radikale für einen sogenannten „Etching“-Prozess maßgeblich verantwortlich sind. Wie auch in der vorliegenden Arbeit konnten Fricke und Kollegen keinen signifikanten Einfluss auf die Biofilmmasse nach Exposition mit dem Gasgemisch beobachten. Auch Xu und Kollegen wiesen einen verbesserten antimikrobiellen Effekt auf Biofilme von *S. aureus* durch die Beimischung von Sauerstoff zu einem Helium-Plasma nach (Xu et al. 2017).

Neben der Zusammensetzung der Plasmen spielen bei der Beseitigung der Biofilme auf Implantat Oberflächen aber auch Biofilm-spezifische Eigenschaften eine wichtige Rolle. So

nimmt u.a. die EPS-Matrix einen großen Einfluss auf den Erfolg der Plasma-Behandlung. Die Zusammensetzung der EPS-Matrix variiert dabei abhängig von der Spezies, besteht aber generell aus Polysacchariden, Lipiden, Proteinen und extrazellulärer DNA (Flemming und Wingender 2010). Wie schon hinreichend untersucht wurde, bildet die EPS-Matrix nicht nur einen Schutz einzelner Bakterien innerhalb des Biofilms vor antibiotischen Substanzen oder Bioziden, sondern auch vor Plasma-Bestandteilen wie reaktiven Spezies, geladenen Partikeln und Photonen (Flemming und Wingender 2010; Mai-Prochnow et al. 2014; Mai-Prochnow et al. 2016). So wurden von Alkawareek und Kollegen an Biofilmen von *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* Untersuchungen vorgenommen, die Bestandteile der EPS-Matrix für das Abfangen reaktiver Spezies verantwortlich zeigen (Alkawareek et al. 2012). Ähnliches wurde für die freien Radikale der menschlichen Leukozyten gezeigt (Simpson et al. 1989). Somit sind u.a. längere Behandlungszeiten notwendig, um die Biofilme zu penetrieren und die EPS-Matrix zu destabilisieren. Nach erfolgreicher Desintegration der EPS-Matrix, sind die Bakterien innerhalb des Biofilms für die Plasma-spezifischen Bestandteile besser erreichbar (Traba und Liang 2011). In der vorliegenden Arbeit wurden Behandlungszeiten von einer und drei Minuten untersucht. Anhand der Vitalitätsbestimmung, der Biofilmmassen-Quantifizierung sowie der mikroskopischen Analysen wird deutlich, dass eine Minimierung der Biofilm-Vitalität und-Masse abhängig ist von der Behandlungszeit. Die mikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 23) lassen diesbezüglich erkennen, dass nach einer längeren Plasma-Behandlung der Biofilme die EPS-Matrix desintegriert wurde und weniger vitale Bakterien nachgewiesen werden konnten. Das Ergebnis wird weiterhin durch den direkten Vergleich der Plasma-behandelten Proben mit den Biofilmen der Gasgemisch Exposition deutlich. Nach lebend/tot-Färbung sind vermischte rote und grüne Fluoreszenzsignale zu erkennen. Da die Aufnahmen mittels CLSM dokumentiert wurden, ist davon auszugehen, dass grüne Signale aus den tieferen Schichten der Biofilme die roten Signale in den oberen Schichten überstrahlen. Interessanterweise ist dieser Effekt auch für die Biofilme nach dreiminütiger Plasma-Behandlung zu beobachten. Auch die Ergebnisse der Biofilmmassen-Quantifizierung weisen eine höhere Biofilmmasse auf, als die Biofilme nach einer Minute Plasma-Behandlung. Dieser Effekt ist auf das oben genannte „Etching“ der Biofilme sowie den von Bayliss und Kollegen beschriebenen „Shielding“-Effekt der abgetöteten Bakterien zurückzuführen (Fricke et al. 2012; Bayliss et al. 2012).

Neben der Degradation der EPS-Matrix zeigen die REM-Aufnahmen auch eine Beschädigung der Zellwandstrukturen von *S. epidermidis* nach der Plasma-Behandlung. Diese sind auf die durch das Plasma hervorgerufene Oxidation der Zellwandbestandteile wie Lipiden, Glykoproteinen und Proteinen zurückzuführen (Alkawareek et al. 2012). Als Folge dessen kommt es zu einer Desintegration der Zellwand-und Membranen und somit zur Zellyse

(Joaquin et al. 2009; Koban et al. 2010; Vollmer et al. 2008; Rogers et al. 1980). Zusätzlich können geladene Teilchen, die durch Plasma erzeugt werden, zu einer Membranlyse führen, wenn elektrostatische Kräfte die Zugfestigkeit der Zellwand überwinden (Geyter und Morent 2012; Lunov et al. 2016; Liao et al. 2017). Allerdings wurde dieser Effekt in erster Linie bei einer direkten Plasma-Behandlung mittels DBD beobachtet (Mendis et al. 2000; Laroussi et al. 2003; Laroussi 2009). Auch die Zusammensetzung und Stärke der bakteriellen Zellwand hat maßgeblichen Einfluss auf die antimikrobielle Wirkung von kalten Atmosphärendruckplasmen. Gram-negative Bakterien reagieren dabei sensitiver auf die Plasma-Einwirkung als gram-positive Spezies. Der Grund dafür liegt in der spezifischen Zellwandarchitektur gram-positiver und -negativer Bakterien (Laroussi et al. 2003; Stoffels et al. 2008). Während gram-positive Bakterien neben der zytoplasmatischen Membran, bestehend aus Phospholipiden, eine stark ausgeprägte Peptidoglykan-Schicht besitzen, weisen gram-negative Bakterien zusätzlich eine äußere Membran, bestehend aus Phospholipiden und Lipopolysacchariden auf (Koebnik et al. 2000). Die Peptidoglykan-Schicht gram negativer Bakterien ist deutlich schwächer ausgeprägt und bildet den periplasmatischen Raum zwischen der inneren und äußeren zytoplasmatischen Membran. Wie bereits genannt, ist die Peroxidation von Lipiden ein bekannter Mechanismus der Plasma-Inaktivierung (Vatansever et al. 2013). Aus der Literatur ist bekannt, dass insbesondere Membran-Lipide auf Grund ihrer exponierten Position besonders sensitiv gegenüber oxidativem Stress durch z. B. ROS und physikalischen Belastungen sind (Montie et al. 2000). Ein weiterer Faktor, der die Sensitivität von gram-negativen Bakterien gegenüber kalten Plasmen erhöht, ist der hohe Anteil von Porinen in der äußeren Membran dieser, wodurch die aktiven Bestandteile der Plasmen besser in die Zelle penetrieren können (Mai-Prochnow et al. 2016). Han und Kollegen konnten allerdings nachweisen, dass der intrazelluläre Schaden durch aktive Spezies in gram-positiven Bakterien stärker ausgeprägt war (Han et al. 2015). Die antimikrobielle Wirkung gegen *S. aureus* war dabei auf die Akkumulation intrazellulärer ROS zurückzuführen, während *E. coli* durch die Schädigung der Zellwand inaktiviert wurde. Bei beiden untersuchten Bakterien wirkte sich jedoch eine Verlängerung der Behandlungszeit positiv auf die generierten intrazellulären ROS aus.

4.3 Revitalisierung der Biofilme von *S. epidermidis* auf TiAlV-Oberflächen nach Plasma-Exposition

Eine nachhaltige Entfernung und Inaktivierung von Biofilmen auf Implantat-Oberflächen stellt weiterhin ein großes Problem der Plasmamedizin dar. So konnte in der vorliegenden Arbeit zwar eine Reduktion der Vitalität von *S. epidermidis* innerhalb der Biofilme um mehr als 99 % erreicht werden, allerdings zeigten die Quantifizierung der Biofilmmasse sowie die qualitativen mikroskopischen Aufnahmen keine vollständige Entfernung der Biofilme auf den TiAlV-Oberflächen. Xu und Kollegen konnten beobachten, dass Biofilmstrukturen von *S. aureus*

nach der Behandlung mit einem Helium-Plasma zwar inaktiviert wurden, diese dennoch weiterhin auf der Kultivierungsfläche nachgewiesen werden konnten. Eine vollständige Beseitigung der Biofilme durch alleinige Plasma-Behandlung wurde somit nicht erreicht. Auch die von Idlibi und Kollegen untersuchten oralen Biofilme konnten mittels alleiniger Plasma-Behandlung nicht von den eingesetzten maschinieren Titan-Oberflächen entfernt werden (Idlibi et al. 2013). Lediglich durch eine kombinierte Behandlung von Plasma mit mechanischer Einwirkung konnte bisher eine vollständige Beseitigung von Biofilmen nachgewiesen werden (Rupf et al. 2011; Duske et al. 2015a; Matthes et al. 2017). Demnach besteht nach Abschluss der Plasma-Behandlung die Gefahr des erneuten Wachstums durch residuale viable Bakterien.

In der vorliegenden Arbeit wurden die restlichen Biofilmstrukturen nach Plasma-Exposition erneut für 24 h in TSB-Medium kultiviert. Mit Hilfe dieses Revitalisierungsversuchs sollte gezeigt werden, ob die Biofilme durch die Plasma-Behandlung irreversibel geschädigt wurden. Anhand der Ergebnisse der Lebendkeimzahlbestimmung (Abbildung 16) ist deutlich zu erkennen, dass die Vitalität von *S. epidermidis* innerhalb der Biofilme nach der Plasma-Exposition erneut zunimmt, was zunächst auf den generellen Versuchsaufbau zurückzuführen ist. Da die Biofilme auf den TiAlV-Probekörpern ($\varnothing = 11$ mm) nur punktuell für eine bzw. drei Minuten behandelt wurden, ist nicht jeder Bereich der Probekörper mit dem Plasma behandelt worden. Typischerweise besitzt der Effluent der kINPen-Quellen einen Durchmesser von 1-7 mm (Metelmann et al. 2016; Fricke et al. 2012). Die Versuchsanordnung erfolgte in Anlehnung an Fricke und Kollegen. Sie wiesen nach, dass Biofilme von *C. albicans* durch Zumischung von 1 % Sauerstoff zu einem Argon-Plasma (kINPen08) nach einer Behandlungszeit von 5 min nahezu vollständig von der Kultivierungsoberfläche entfernt werden konnten (Fricke et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit weist die Quantifizierung der Biofilmmasse nach, dass der Biofilm nach der Revitalisierung wieder vital ist, die Biofilmmasse aber lediglich um 37 % bzw. 14 % nach einer bzw. drei Minuten Plasma-Exposition ansteigt (siehe Vergleich Abbildung 12 und Abbildung 16). Traban und Liang zeigten an Biofilmen von *S. aureus*, dass sich die Biofilmmasse nach der Plasma-Exposition und erneuter Kultivierung nicht veränderte (Traba und Liang 2011). In ihrem Fall konnten die Lebendkeimzahlbestimmung und ein metabolischer Test allerdings beweisen, dass die Biofilme avital waren. Interessanterweise wurden hier aber vitale Bakterien im Medium-Überstand der Biofilme nachgewiesen. Dies führen die Autoren auf das Etching der EPS-Matrix zurück, wodurch vitale Mikrokolonien, die durch das Plasma nicht beeinträchtigt wurden über den Medium-Überstand nach der Plasma-Exposition erneut den Biofilm aufbauen können. Vergleicht man weiterführend die Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der vorliegenden Arbeit nach der direkten Plasma-Behandlung sowie nach der Revitalisierung, wird deutlich, dass nach der Revitalisierung deutlich mehr grüne Fluoreszenzsignale nachweisbar sind. Dies deutet da-

rauf hin, dass ein Großteil von *S. epidermidis* innerhalb der tieferen Schichten des Biofilms durch die direkte Plasma-Behandlung zum Selbstschutz in den VBNC-Zustand (**V**iable-**B**ut-**N**ot-**C**ulturable) übergeht. Während dieses Zustands besitzen die Bakterien weiterhin eine intakte Membran, Wachstums- und Teilungsprozesse sind aber eingestellt (Oliver 2005; Trevors 2011). Dieser Zustand ist nach Plasma-Exposition nicht unüblich, als Antwort auf einen oder mehrere Stressfaktoren (z. B. UV-Strahlung, oxidativer Stress) (Abramzon et al. 2006; Joaquin et al. 2009; Ben Said et al. 2010; Cooper et al. 2010; Brelles-Mariño 2012; Pinto et al. 2015). So zeigten u.a. Xu und Kollegen, dass ein Anteil von 5 % der Biofilme von *S. aureus* nach einer Behandlung mit einem Helium-Plasma für 10 min in den VBNC-Zustand übergeht (Vandervoort et al. 2008; Marchal et al. 2012; Xu et al. 2017). Durch subletale kurze Behandlungszeit wird der VBNC-Zustand weiterhin gefördert (Moreau et al. 2005; Rowan et al. 2008). Werden diese Bakterien nun durch z. B. erneute Kultivierung reaktiviert bzw. befinden sich als Mikrokolonien geschützt im Medium-Überstand, sind diese ohne weiteres in der Lage den Biofilm erneut zu re-populieren. Anhand der REM-Bilder ist allerdings erkennbar, dass die Morphologie der Biofilme, insbesondere der EPS-Matrix auch nach erneuter Kultivierung für 24 h durch die Plasma-Behandlung irreversibel geschädigt wurde.

Die Ergebnisse der Revitalisierung zeigen deutlich, dass eine alleinige Behandlung der Biofilme mit kaltem Plasma und den hier gewählten Behandlungszeiten sowie einer punktuellen Behandlung diese nicht vollständig abtötet und von der TiAlV-Oberfläche entfernt.

4.4 Empfindlichkeit von *S. epidermidis* im Biofilm auf TiAlV-Oberflächen nach Plasma-Exposition gegenüber ausgewählten Antibiotika

Die Oberfläche orthopädischer Implantate bietet die optimale Umgebung für Bakterien an diese zu adhären und einen Biofilm auszubilden (Cos et al. 2010). Konventionelle antimikrobielle chemische (Antibiotika, Ethylenoxid) oder physikalische (Autoklavieren, Gamma-Sterilisation) Behandlungsmethoden sind nur geringfügig zur vollständigen Inaktivierung und Entfernung von bakteriellen Biofilmen auf Oberflächen einsetzbar (Chen und Stewart 2000; Vickery et al. 2000). Dieses Problem besteht im gleichen Maße für Implantat-assoziierte Infektionen. Eine der wesentlichen Eigenschaften von Biofilmen ist die um ein vielfaches erhöhte Resistenz gegenüber antibiotischen Substanzen sowie dem Immunsystem des Wirtsorganismus (Cos et al. 2010). Innerhalb der Biofilme weisen bakterielle Spezies eine um bis zu 1000-fach höhere Resistenz gegenüber antibiotischen Substanzen auf als planktonisch lebende Spezies (Ceri et al. 1999; Mah und O'Toole 2001; Wu et al. 2003; Brooks und Jefferson 2012). Bestehende Antibiotika sind bei typischen Dosierungen zur Behandlung von Biofilm-Infektionen weniger wirksam, da sie nur die empfindlichen Biofilmpopulationen abtöten, phänotypische Varianten innerhalb des Biofilms dagegen unbeeinträchtigt bleiben. Ins-

besondere systemische Antibiotikabehandlungen, können das Biofilmwachstum zwar unterdrücken, den Biofilm aber nicht vollständig beseitigen (Stoodley et al. 2002; Patel 2005; Lewis 2008). Implantat-assoziierte Infektionen werden aus dem Grund als äußerst komplizierte und potentiell lebensbedrohliche Komplikationen eingestuft (Costerton et al. 1999; Donlan und Costerton 2002; Jorge et al. 2012; Vertes et al. 2012). Die unterschiedlichen Resistenzmechanismen von Bakterien innerhalb eines Biofilmes werden durch verschiedene Faktoren angeregt (Stewart 2002). So können z. B. Nährstoff- und Sauerstoffarmut innerhalb eines Biofilms dazu führen, dass einige Bakterien in einen stationären Zustand übergehen, was sie weniger empfindlich gegenüber Wachstums-abhängigen Antibiotika macht (Cos et al. 2010). Es wurde aber auch beschrieben, dass Subpopulationen von Bakterien innerhalb der Biofilme in einen phänotypisch resistenten Zustand differenzieren (Lewis 2008). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass einige Spezies innerhalb eines Biofilms spezifische antimikrobielle Resistenz-Gene exprimieren, die nicht für die Biofilmbildung benötigt werden (Patel 2005). Aber auch die Strukturierung und drei-dimensionale Anordnung eines Biofilms selbst dient als physikalische Barriere gegenüber antimikrobiellen Substanzen, in dem z. B. die Penetration in tiefere Schichten des Biofilms verhindert wird (Stewart und Costerton 2001; Stoodley et al. 2002; Lynch und Abbanat 2010). Die Fähigkeit der EPS-Matrix, als physikalische Barriere zu wirken, hängt jedoch von der Art der verwendeten Antibiotika, der Konzentration sowie der Bindung an die EPS-Matrix ab (Picioreanu et al. 2000a, 2000b). Insbesondere geladene oder chemisch reaktive Substanzen dringen auf Grund der negativ geladenen EPS-Matrix nicht in die tieferen Schichten des Biofilms vor, da diese wie eine Ionenaustausch-Barriere wirkt (Costerton et al. 1995). Es konnte jedoch an Biofilmen von *S. aureus* und *S. epidermidis* gezeigt werden, dass einige kleine Moleküle wie Wasser und Sauerstoff durch Verwendung von Kanälen mit unterschiedlichen Durchmessern sich frei im gesamten Biofilm bewegen (Dunne et al. 1993; Jefferson et al. 2005).

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass kaltes Plasma Biofilme, insbesondere die Antibiotika-resistenter Spezies wie MRSA, ESKAPE Pathogene oder auch *Burkholderia cenocepacia*, inaktiviert (Bayliss et al. 2012; Flynn et al. 2015; Alshraideh et al. 2016; Napp et al. 2016). Die Auswirkungen der Plasmen sind dabei jedoch sehr unterschiedlich, wobei die Produktion von Biomasse und Katalase eine wichtige Rolle bei der Biofilmtoleranz gegenüber der Plasmaexposition spielt (Bourke et al. 2017). In der vorliegenden Arbeit wurden Biofilme des Gentamicin-resistenten Stamms *S. epidermidis* RP62A hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Gentamicin-Sulfat nach Plasma-Exposition für eine bzw. drei Minuten untersucht. Zunächst wurde die minimale Hemmkonzentration von Gentamicin-Sulfat an Plasma-exponierten Biofilmen mittels E-Test untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Zunahme der Gentamicin Sensitivität von *S. epidermidis* Biofilmen durch Plasma-Exposition für eine bzw. drei Minuten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auch Bayliss

und Kollegen konnten eine Reduktion der MIC von Kanamycin und Trimethoprim gegen MRSA nach Plasma-Exposition über 30 s nachweisen (Bayliss et al. 2012). Kanamycin und Gentamicin zählen zu den Konzentrations-abhängigen bakteriziden Antibiotika der Gruppe der Aminoglykoside (Mingeot-Leclercq et al. 1999; Tenson et al. 2003). Diese durchdringen die bakterielle Zellmembran aktiv oder mittels Diffusion, um an die 30S-Untereinheit der Ribosomen zu binden. Dadurch kommt es zum fehlerhaften Ablesen der mRNA, sodass die Proteinbiosynthese ausbleibt bzw. fehlerhafte Proteine exprimiert werden. Als Konsequenz werden z. B. fehlerhafte Nonsense-Proteine in die bakterielle Zellwand eingebaut (Mingeot-Leclercq et al. 1999; Tenson et al. 2003). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sowohl die EPS-Matrix, als auch die Zellwände von *S. epidermidis* durch Plasma-Exposition beschädigt wurden (siehe Abschnitt 3.1.2). Die erhöhte Gentamicin-Sensitivität von *S. epidermidis* ist möglicherweise auf eine erhöhte Penetration der Biofilme nach Plasma-Behandlung zurückzuführen. Auch die Reduktion der MIC durch die Argon-Sauerstoff-Kontrolle lässt sich durch das Etching der EPS-Matrix und der damit verbundenen teilweisen Entfernung von Mikrokolonie aus dem Biofilmverbund erklären. Einen ähnlichen Effekt beschreiben auch Lührmann und Kollegen. In ihrer Arbeit wurde mit Hilfe der Agar-Diffusionsmethode die Empfindlichkeit verschiedener *S. aureus* Subpopulationen auf verschiedene Antibiotika in Kombination mit einer Plasma-Behandlung untersucht (Bayliss et al. 2012; Lührmann et al. 2016). Hierbei wiesen sie wie schon Bayliss und Kollegen eine erhöhte Sensitivität von *S. aureus* gegenüber Trimethoprim nach. Als Kontrolle diente auch in diesem Fall Argon ohne Plasma-Behandlung.

Da für den E-Test in der vorliegenden Arbeit die Bakterien aus ihren Biofilmstrukturen gelöst werden mussten, wurden im Anschluss an die MHK-Bestimmung Untersuchungen der Gentamicin-Sensitivität an intakten Biofilmen von *S. epidermidis* auf TiAlV-Probekörpern durchgeführt. Dazu wurden die Biofilme nach der Plasma-bzw. Gas-Exposition für 24 h in Gentamicin-haltigem TSB-Medium kultiviert. Die Ergebnisse der Lebendkeimzahlbestimmung zeigen dabei eine deutliche Reduktion der vitalen Bakterien um vier Zehnerpotenzen innerhalb der unbehandelten Kontrolle durch den alleinigen Einfluss von Gentamicin. In Kombination mit der Plasma-Behandlung kommt es sogar zu einer vollständigen Reduktion der vitalen Bakterien innerhalb des Biofilms nach kombinierter Plasma- und Gentamicin-Behandlung. Auch nach der kombinierten Behandlung mit dem Gasgemisch und Gentamicin wurden keine vitalen Bakterien innerhalb der Biofilme nachgewiesen. Aus der Literatur ist bekannt, dass insbesondere die EPS-Matrix von *S. epidermidis* Biofilmen die Aktivität diverser Antibiotika reduziert, da die Biofilme nicht hinreichend penetriert werden können (Souli und Giamarellou 1998; König et al. 2001; Mathur et al. 2005; Rodríguez-Martínez et al. 2007). Die verringerte Diffusionsgeschwindigkeit von Antibiotika durch die EPS-Matrix in den Biofilm fördert die Expression von Resistenzgenen, die dann in den tieferen Schichten des

Biofilms aktiviert werden (Donlan und Costerton 2002; Høiby et al. 2010). Zusätzlich kommt es zu einem graduellen Verdünnungseffekt der Antibiotika durch die Wachstumshemmung bzw. Abtötung der Bakterien in den obersten Schichten des Biofilms (Donlan und Costerton 2002; Bagge et al. 2004; Mai-Prochnow et al. 2008). Auf Grund der Desintegration der EPS-Matrix durch die Plasma-bzw. Gasgemisch-Behandlung ist ein gesteigertes Eindringen von Gentamicin in den Biofilm denkbar. Die REM-Aufnahmen belegen diesen Effekt lediglich qualitativ. Neben des Etching-Prozesses der EPS-Matrix sowie der bakteriellen Zellwände ist auch die Akkumulation von ROS an der antimikrobiellen Wirkung von kalten Plasmen beteiligt. Durch die Desintegration der EPS-Matrix penetrieren ROS einfacher in tiefere Schichten des Biofilms, sodass einzelne Bakterien den reaktiven Spezies ausgesetzt sind, was dann zu einer Beschädigung der bakteriellen Zellmembran führt (Traba und Liang 2015). Somit wird Zellwand-gängigen Antibiotika ein einfacheres Eindringen in die Bakterien möglich. Neben oxidativen Stress durch ROS nach Plasma-Behandlung kommt es durch die zusätzliche Behandlung mit Gentamicin-Sulfat zu einer gesteigerten Belastung mit ROS. Dwyer und Kollegen konnten nachweisen, dass eine Behandlung von *E. coli* mit bakteriziden Antibiotika zur Entwicklung von ROS durch metabolische Mechanismen führt, welche wiederum die Abtötung der Bakterien begünstigt (Dwyer et al. 2007; Dwyer et al. 2012).

Da wie schon oben beschrieben durch alleinige Plasma-Behandlung keine vollständige Entfernung der Biofilme auf den Probekörpern erreicht werden konnte, wurde neben der Lebendkeimzahl auch die Biofilmmasse quantifiziert sowie mikroskopische Aufnahmen zur Morphologie und Vitalität der Biofilme angefertigt (Rupf et al. 2011; Duske et al. 2015a; Matthes et al. 2017). Die Quantifizierung der Biofilmmasse zeigt deutlich, dass die Biofilme nach Plasma-und Gasgemisch-Exposition nicht vollständig von den Probekörpern entfernt werden konnten. Der direkte Vergleich zwischen den behandelten Proben weist auf eine deutlich größere Biofilmmasse nach Gasgemisch-Exposition hin. Anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wird deutlich, dass durch die kombinierte Behandlung mit dem Gasgemisch und Gentamicin-Sulfat noch vitale Bakterien in den Überresten der Biofilme zu detektieren sind. Somit ist davon auszugehen, dass die Bakterien in den tieferen Schichten des Biofilms in VBNC-Zustand übergegangen sind (Abramzon et al. 2006; Joaquin et al. 2009; Brelles-Mariño 2012). Dieser Zustand ist wie schon oben beschrieben nach Einfluss von Stressfaktoren wie oxidativem Stress oder Antibiose nicht unüblich.

4.5 Revitalisierung von *S. epidermidis* im Biofilm auf TiAlV-Oberflächen nach kombinierter Plasma- und Gentamicin-Behandlung

Auf Grund der unvollständigen Beseitigung von Biofilmen auf Implantat-Oberflächen kommt es immer wieder zur erneuten Ausbreitung der Infektion. Das Versagen der Sterilisation orthopädischer Implantate nach einer Infektion kann zu einer längeren Antibiotikatherapie, langen Krankenhausaufenthalten und einer erhöhten Morbidität des Patienten führen (Traba et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte bisher gezeigt werden, dass Biofilme von *S. epidermidis* nach einer kombinierten Plasma- und Gentamicin-Behandlung zwar avital sind, Biofilmstrukturen dennoch auf den TiAlV-Oberflächen nachgewiesen wurden. Aus diesem Grund wurden die Biofilme nach der kombinierten Behandlung erneut für 24 h kultiviert. Anhand der Ergebnisse der Lebendkeimzahlbestimmung wird deutlich, dass diese nach der Gasgemisch- und Gentamicin-Kombination erneut zunimmt. Dieser Effekt ist schon wie unter 4.4 beschrieben auf den VBNC-Zustand der Bakterien zurückzuführen. Dieser kann durch günstige Bedingungen wie erneuter Nährstoffzufuhr, aber auch nicht ausreichender Antibiose wieder aufgehoben werden (Abramzon et al. 2006; Joaquin et al. 2009; Brelles-Mariño 2012; Pinto et al. 2015). Auch die mikroskopischen Aufnahmen bestätigen dieses Ergebnis. Im Gegensatz dazu ist für die Biofilme nach kombinierter Plasma- und Gentamicin-Behandlung keine Zunahme der Lebendkeimzahl zu detektieren, sodass von einer vollständigen Inaktivierung der Vitalität der Biofilme auszugehen ist. Bisher gibt es in der Literatur keine bekannten vergleichbaren Untersuchungen zur kombinierten Wirkung von kalten Plasmen und Antibiotika auf bakterielle Biofilme. Pandit und Kollegen zeigten eine effektive Beeinträchtigung der EPS-Matrix-Produktion durch Zugabe von Vitamin C zu plasma-behandelten Biofilmen von *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* und *S. epidermidis*. Dies führt zu einer Verringerung der Biofilmkomplexität und könnte somit die Anfälligkeit der Bakterien innerhalb der Biofilme gegenüber verschiedenen antimikrobiellen Substanzen erhöhen (Pandit et al. 2017).

4.6 Empfindlichkeit von *S. epidermidis* nach Plasma-Behandlung gegenüber ausgewählten Antibiotika im planktonischen Zustand

Auf Grund der positiven Ergebnisse zur Untersuchung der Erhöhung der Gentamicin-Empfindlichkeit von *S. epidermidis* nach Plasma-Behandlung, wurden diese auch auf weitere Antibiotika getestet. Weiterhin sollte untersucht werden, ob potentiell abgelöste einzelne Bakterien bzw. Mikrokolonien aus den Biofilmen nach der Plasma-Exposition eine erhöhte Sensitivität gegenüber den gewählten Antibiotika aufweisen. Das angefertigte Antibiotogramm für *S. epidermidis* RP62A verdeutlicht, dass *S. epidermidis* RP62A gegen eine Vielzahl weiterer Antibiotika resistent sind. So wurden u.a. Resistenzen gegen das Makrolid-Antibiotikum

Erythromycin und Ampicillin nachgewiesen. Wie Gentamicin wirkt auch Erythromycin translationshemmend auf die Proteinsynthese der Bakterien ein, indem es an die 50S-Untereinheiten der bakteriellen Ribosomen bindet. Ampicillin hingegen gehört zur Gruppe der β -Laktam Antibiotika und hemmt das bakterielle Wachstum insbesondere aktiver, sich teilender Bakterien, indem es durch Blockieren der Transpeptidase (Penicillin-bindende Proteine) nach der Teilung der Bakterien die Neusynthese der Zellwand verhindert. Sowohl Gentamicin, als auch Erythromycin und Ampicillin wirken, abhängig von ihrer Konzentration, bakterizid. Zunächst wurden die MHK für Ampicillin und Erythromycin bestimmt, wie schon unter 4.4 beschrieben. Dazu wurden die Biofilme nach der Plasma-Behandlung mit Hilfe eines Ultraschall-Verfahrens von den TiAlV-Oberflächen gelöst. Wie auch schon für die MHK-Bestimmung von Gentamicin lagen die Bakterien aus der Biofilmstruktur herausgelöst vor, sodass in diesem Fall von planktonischen Bakterien ausgegangen wird. Anhand der MHK-Bestimmung von Ampicillin wird deutlich, dass weder durch Plasma-noch Gas-Behandlung eine signifikante Erhöhung der Sensitivität von *S. epidermidis* gegenüber Ampicillin nachzuweisen ist. Wie schon von Lührmann und Kollegen beschrieben, konnte auch für *S. aureus* nur eine geringfügig erhöhte Sensitivität gegenüber Oxacillin, einem β -Laktam Antibiotikum, detektiert werden (Lührmann et al. 2016). Im Gegensatz dazu konnte von Hoon Park und Kollegen gezeigt werden, dass mittels eines Argon-Plasmas (DBD) die β -Laktamase-Aktivität von MRSA reduziert und somit die Empfindlichkeit gegenüber β -Laktam-Antibiotika erhöht wird (Park et al. 2015). In beiden Studien wurde allerdings nicht der Einfluss der Plasmen auf Biofilme, sondern auf vollständig planktonisch kultivierte *S. aureus* getestet. Auf Grund des Studiendesigns der vorliegenden Arbeit, in dem Biofilm-gebundene *S. epidermidis* zunächst mit Plasma behandelt wurden und erst im Anschluss in ihrem planktonischen Zustand untersucht wurden, ist davon auszugehen, dass dieser Unterschied einen enormen Einfluss auf Antibiotika-Empfindlichkeit hat. So wurden wie schon in Abschnitt 4.2 und 4.3 erläutert, nicht alle Schichten des Biofilms durch das Plasma penetriert. Es ist also davon auszugehen, dass Bakterien der tieferen Schichten unbeeinflusst durch die Plasma-Effekte wachsen konnten. Auch ist durch den Eintritt einiger Bakterien in den VBNC-Zustand von der Bildung sogenannter „Persiter“-Zellen auszugehen, wodurch diese weniger sensitiv bis vollständig resistent gegenüber Antibiotika sind (Dawson et al. 2011; Bayliss et al. 2012).

Da die MHK für Erythromycin außerhalb der Nachweisgrenze der kommerziellen E-Test-Streifen lag, konnten keine quantitativen Daten erhoben werden. Somit wurden nachfolgenden Wachstumskinetiken für den Einfluss von Gentamicin, Ampicillin und Erythromycin in einem Konzentrationsbereich von 1 $\mu\text{g/ml}$ bis 1000 $\mu\text{g/ml}$ durchgeführt. Zunächst wurde anhand der Wachstumskinetiken von *S. epidermidis* nach Plasma-bzw. Gas-Behandlung nachgewiesen, dass keine der beiden Behandlungen einen nachhaltigen Effekt auf das Wachstum von *S. epidermidis* ausübt. Diese Ergebnisse decken sich mit den Revitalisierungsunter-

suchungen der Biofilme nach Plasma-bzw. Gas-Exposition wie schon in Abschnitt 4.3 beschrieben. Nach Zugabe von 1 µg/ml Gentamicin ist ein verzögertes Wachstum insbesondere der Gas-exponierten Bakterien zu beobachten. Auch Lührmann und Kollegen konnten einen ähnlichen Effekt auf *S. aureus* beobachten. Sie erklären dieses Phänomen mit der höheren mechanischen Belastung der Bakterien durch das pure Argon-Gas, da durch die Zündung von Plasma der effektive Gasfluss negativ beeinflusst wird (Lührmann et al. 2016). Für Ampicillin und Erythromycin konnte für die Konzentration von 1 µg/ml kein Wachstumshemmender Effekt durch Plasma-oder Gas-Exposition nachgewiesen werden. Auf Grund der Daten des Antibiogramms sowie der MHK-Bestimmung war dieses Ergebnis nicht gänzlich unerwartet. Nach einer Erhöhung der Konzentration um das 10-fache wurde lediglich für Gentamicin ein verzögertes bis vollständig gehemmtes Wachstum von *S. epidermidis* nach Plasma-bzw. Gas-Exposition im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle detektiert. Diese Ergebnisse decken sich mit den bereits diskutierten Ergebnissen aus Abschnitt 4.4 und 4.5. Für Ampicillin konnte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gezeigt werden, dass lediglich diese durch den Einfluss von 100 µg/ml Ampicillin in ihrem Wachstum beeinflusst wird. Für die Plasma-bzw. Gas-exponierten Bakterien ist sogar ein unverändertes Wachstumsverhalten zu beobachten. Dieser Effekt ist auf die bereits diskutierten resistenten „Persister“-Bakterien zurückzuführen (Dawson et al. 2011; Bayliss et al. 2012). Auch demonstrieren diese Ergebnisse die subletale Dosis von Ampicillin für *S. epidermidis* RP62A. Für Biofilme von Staphylokokken sowie *P. aeruginosa* konnte gezeigt werden, dass subletalen Dosen von β -Laktam-Antibiotika zu einer erhöhten Produktion der EPS-Matrix führten (Permin et al. 1983; Dunne 1990; Rachid et al. 2000). Die Wachstumskinetiken unter Einfluss von Erythromycin weisen auch bei einer Konzentration von 100 µg/ml keine Beeinträchtigung der Bakterien nach. Nach einer erneuten Steigerung der Ausgangskonzentration um das 1000-fache konnte kein Wachstum von *S. epidermidis* unter Einfluss von Gentamicin nachgewiesen werden. Lediglich für die Gas-exponierten Bakterien ist ein verzögertes Wachstum zu beobachten. Dieser Effekt lässt sich mit der Aktivierung von Stressantwort-Systemen von *S. epidermidis* durch Argon-Exposition erklären. Obwohl Argon als inertes Gas beschrieben ist, konnten Winter und Kollegen an *Bacillus subtilis* nachweisen, dass durch Behandlung mit Argon-Gas spezifische Gene des Stress-Response-Systems aktiviert wurden (Winter et al. 2013). Auch für Ampicillin wurde bei einer Konzentration von 1000 µg/ml eine Wachstumshemmung detektiert, unabhängig von Plasma-oder Gasgemisch-Exposition. Somit ist von einer letalen Dosis von Ampicillin auszugehen. Für Erythromycin hingegen konnte auch bei einer Konzentration von 1000 µg/ml keine Wachstumshemmung erreicht werden. Lediglich die leicht erhöhten Verdopplungszeiten und Wachstumsraten von *S. epidermidis* nach Plasma-bzw. Gas-Behandlung weisen auf einen marginalen Effekt der Behandlung hin. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Resistenz von *S. epidermidis* gegenüber Erythromycin weniger auf die

EPS-Matrix innerhalb der Biofilme zurückzuführen ist. Diese wird hauptsächlich durch *erm*-Gene kodierte Methylasen vermittelt (He et al. 2016). Durch subletale Dosen von Erythromycin wird somit die Expression dieser Gene unterstützt. Weiterhin wird, wie schon für β -Laktam-Antibiotika beschrieben, die Biofilmbildung durch subletale Dosen von Makrolid-Antibiotika gefördert (Wang et al. 2010). Somit scheint die Erhöhung der Gentamicin-Sensitivität nach Plasma-Exposition nicht allein auf die Desintegration der EPS-Matrix des Biofilms sowie der Oxidation der Zellwand von *S. epidermidis* zurückzuführen zu sein. Wie schon oben diskutiert, spielen die generierten ROS außerhalb, aber auch innerhalb der Bakterien eine genauso wichtige Rolle.

4.7 Empfindlichkeit von *S. epidermidis* nach Plasma-Behandlung gegenüber oxidativem Stress

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist die Entwicklung von Resistenzen gegenüber kalten Plasmen unbekannt und auch auf Grund der unspezifischen antimikrobiellen Wirkung nicht zu erwarten (Helmke et al. 2011; Wu et al. 2012; Zimmermann et al. 2012; Matthes et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde zur Untersuchung der Resistenzbildung von *S. epidermidis* RP62A ein Agar-Platten basiertes System nach Mai-Prochnow und Kollegen angewendet (Mai-Prochnow et al. 2015). Mit Hilfe dieses vereinfachten Systems, ähnlich der Hemmhof-Testung antimikrobieller Substanzen, ist eine schnelle Testung der primären und erworbenen Resistenzbildung gegenüber kalten Plasmen über mehrere Generationen möglich (Zimmermann et al. 2012). Anhand der Hemmhof-Größe sowie einzelner Kolonien innerhalb dieser lassen sich Rückschlüsse über die Sensitivität der getesteten Spezies gegenüber kalten Plasmen ziehen. So entsprechen große Hemmhöfe, die um den Behandlungspunkt des Plasma-Jets herum entstehen einer höheren Sensitivität gegenüber der Plasma-Behandlung. Können aus diesen Hemmhöfe dann einzelne Kolonien isoliert werden, spricht dies für eine Unempfindlichkeit (primäre Resistenz) dieser gegenüber der Plasma-Exposition. In einem nachfolgenden Schritt können diese Kolonien erneut kultiviert und den Plasmen ausgesetzt werden. Im Fall der zweiten Plasma-Behandlung der unempfindlichen Subpopulation entsprechen entstehende kleine Hemmhöfe einer Resistenz dieser gegenüber der primären Behandlung. Große Hemmhöfe hingegen weisen auf eine gesteigerte Sensitivität der Subpopulationen gegenüber der Plasma-Exposition hin. In der vorliegenden Arbeit wurden das Plasma des kINPen08 sowie das Argon-Sauerstoff-Gemisch für Expositionszeiten von einer und drei Minuten untersucht. Anhand der Ergebnisse der Hemmhof-Testung wird deutlich, dass die Sensitivität von *S. epidermidis* zeitabhängig ist. Längere Expositionszeiten führten bei der Kontrolle zu größeren Hemmhöfen. Auch wurden vereinzelt Kolonien am Rand der Hemmhöfe detektiert, isoliert und weiter kultiviert. Diese sprechen für eine zunächst primäre Resistenz gegenüber der Plasma-Behandlung (Zimmermann et al. 2012). Für die Gas-

Kontrolle hingegen konnten keine Hemmhöfe nachgewiesen werden, sodass keine Sensitivität gegenüber dem Gasgemisch besteht. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit der untersuchten antimikrobiellen Wirkung aus Abschnitt 4.2. Dessen ungeachtet wurden Kolonien aus dem Bereich der Behandlungszone isoliert und weiterführend kultiviert. Die aus den Hemmhöfen isolierten Subpopulationen von *S. epidermidis* RP62A wurden dann erneut dem Plasma bzw. Argon-Sauerstoff-Gemisch für eine bzw. drei Minuten ausgesetzt. Dies dient der Untersuchung einer erworbenen Resistenz gegenüber der Plasma-bzw. Gas-Behandlung. Auch in diesem Fall wurden zeitabhängig größere Hemmhöfe nach Plasma-bzw. Gas-Exposition und somit eine erhöhte Sensitivität der Kolonien gegenüber der Behandlung nachgewiesen. Dieser Ergebnisse lassen darauf schließen, dass durch die gewählten Parameter der Plasma-und Gas-Exposition keine Resistenz durch *S. epidermidis* ausgebildet wurde. Auch Zimmermann und Kollegen konnten für die getesteten gram-positiven und gram-negativen Bakterien weder eine primäre noch erworbene Resistenz gegenüber einer Plasma-Behandlung nachweisen (Zimmermann et al. 2012). Mai-Prochnow und Kollegen konnten hingegen eine Resistenz von *P. aeruginosa* gegenüber Plasma nach einer zweiten Behandlung von primär exponierten Subpopulationen quantifizieren (Mai-Prochnow et al. 2015). So gehen sie davon aus, dass die überlebenden Subpopulationen entweder auf eine natürliche Mutation von *P. aeruginosa* oder aber auf persistierende Bakterien zurückzuführen sind. Den zweiten, eher realistischen Fall, begründen sie mit der Aktivierung spezifischer Stressantwort-Systeme gegen oxidativen Stress. In der vorliegenden Arbeit wurden somit ergänzende Untersuchungen zur Empfindlichkeit der Plasma-exponierten Subpopulationen von *S. epidermidis* RP6A gegenüber dem stark reaktiven Wasserstoffperoxid (H_2O_2) durchgeführt. Dazu wurden die Subpopulationen unterschiedlichen Konzentrationen von H_2O_2 ausgesetzt und deren Wachstum über 24 h beobachtet. Auf Grund seiner Katalase-Aktivität ist *S. epidermidis* in der Lage H_2O_2 in Sauerstoff und Wasserstoff zu spalten (Chelikani et al. 2004; Gaupp et al. 2012). Für den Routine-Nachweis Katalase-positiver Spezies kommt 3%iges H_2O_2 zum Einsatz, sodass diese Konzentration als Referenz-Konzentration gewählt wurde. Um den oxidativen Stress auf die Plasma-exponierten Subpopulationen von *S. epidermidis* zu erhöhen, wurden diese zusätzlich mit 10%igem H_2O_2 kultiviert. Die Ergebnisse der Wachstumskinetiken zeigen deutlich, dass keine der Subpopulationen unter Einfluss von H_2O_2 ein verändertes Wachstumsverhalten aufweist. Da die Wirkung von Plasma wie schon beschrieben multifaktorieller Natur ist, sind anhand der vorliegenden Ergebnisse keine Rückschlüsse auf den genauen Schädigungsmechanismus zu ziehen. Am Wahrscheinlichsten ist allerdings die direkte Schädigung der DNA durch die Plasma-Behandlung, sodass Stressantwort-Systeme von *S. epidermidis* wie DNA-Reparaturmechanismen (z. B. Basen-und Nukleotid-Exzisionsreparatur, „Mismatch“-Reparatur) nicht reagieren können (Gaupp et al. 2012). So konnten Barraud und Kollegen an *P. aeruginosa* Biofilmen eine er-

höhte Akkumulation von DNA-schädigenden reaktiven Spezies insbesondere in den Mikrokolonien nachweisen (Barraud et al. 2006). Im Gegensatz zu den hier besprochenen Ergebnissen konnten Mai-Prochnow und Kollegen eine erhöhte Verträglichkeit von *P. aeruginosa* gegenüber H_2O_2 detektieren. Diese ist auf die vermehrte Expression eines spezifischen protektiven Pigments zurückzuführen (Mai-Prochnow et al. 2015).

5 Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse zur *in vitro* Plasma-Behandlung bakterieller Biofilme von *S. epidermidis* auf relevanten Implantat-Materialien, dienen als Voruntersuchungen für eine mögliche praktische Anwendung zur adjuvanten Therapie Implantat-assoziierten Infektionen. Da es sich bei den hier vorgestellten Daten sowie Behandlungsansätzen zunächst um in sich beschränkte *in vitro* Daten handelt, wäre eine weiterfolgende Übertragung der Behandlung auf lange Sicht in *in vivo* Tiermodelle sinnvoll. In weiterführenden Versuchen sollten zunächst Behandlungs-sowie Read-Out-Parameter optimiert werden, um spezifische Interaktionen zwischen Biofilm und Plasma-Behandlung zu detektieren. Auf Grund der bisherigen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass der typische Effluent indirekter Plasma-Quellen der kINPen-Serie einen Durchmesser von ca. 7 mm besitzt, während die Behandlungsfläche bisher einen Durchmesser von 11 mm aufweist. Somit sollte der Durchmesser der Probekörper für die bakteriellen Biofilme entsprechend verkleinert werden, um optimale Bedingungen für die Plasma-Behandlung sowie die Ausbreitung des Plasmas auf der Oberfläche zu gewährleisten. Aber auch ein Abrastern der Biofilme könnte zu einer verbesserten Behandlung der gesamten Oberfläche führen. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass durch das Abrastern der Probe das aktive Wirken des Plasmas pro behandelter Fläche sowie Behandlungszeit vermindert ist, im Vergleich zu punktueller Behandlung, sodass auch eine Anpassung der Behandlungsdauer berücksichtigt werden muss. Weiterhin wäre eine Optimierung des Biofilm-Alters durch verschiedene Kultivierungszeiten zur Simulation unterschiedlicher Stadien einer Implantat-assoziierten Infektion denkbar. Auch die Untersuchung der aus dem Biofilme gelösten Bakterien hinsichtlich Adhäsion auf Oberflächen sowie Biofilm-Bildung könnten den bisherigen Versuchsaufbau zur Untersuchung des antimikrobiellen Potentials von kaltem Atmosphärendruckplasma sinnvoll ergänzen.

Ein wesentlicher Aspekt der vorliegenden Arbeit betrachtet die erhöhte Sensitivität der Gentamicin-resistenten Biofilme nach Plasma-Behandlung gegenüber Gentamicin. In weiterführenden Untersuchungen sollte geklärt werden, wie sich die Sensitivität der Biofilme nach Plasma-Behandlung gegenüber anderer Antibiotika verändert. So sollten z.B. auch Ampicillin und Erythromycin nicht nur auf aus dem Biofilme gelöste Bakterien untersucht werden. Weiterhin sollte untersucht werden, wie sich das Membranpotential der Bakterien innerhalb der Biofilme und somit die Membranpermeabilität nach der Plasma-Behandlung verändert. Auch die EPS-Matrix wird, wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, durch die Plasma-Exposition verändert. Diese Änderungen, insbesondere der Zusammensetzung der EPS-Matrix, sollten durch Nachweise der extrazellulären DNA, der Exopolysaccharide (z.B. β -1,6-linked N-acetylglucosamin) sowie extrazellulären Proteine (z.B. Biofilm-assoziierte Oberflächenproteine) analysiert werden.

Wie schon erwähnt, beruht die antimikrobielle Wirkung kalter Atmosphärendruckplasmen auf der direkten Permeabilisierung der bakteriellen Zellwände, aber auch auf der Schädigung intrazellulärer Proteine sowie DNA durch oxidativen Stress. Auch dieser Aspekt der oxidativen Stressantwort sollte in weiterführenden Arbeiten untersucht werden. Dazu wäre der Nachweis intrazellulärer ROS nach Plasma-Behandlung innerhalb von *S. epidermidis* mittels 2'7'-Dichlorodihydrofluorescein oder 4,5-Diaminfluorescein und einer anschließenden Detektion mittels Durchflusszytometrie sinnvoll. Weiterhin könnten intrazelluläre DNA-Strangbrüche durch oxidativen Stress mit Hilfe einer Strangbruch-PCR z.B. nach Rothfuss et al. 2010 nachgewiesen werden. Aber auch die Stressantwort der Bakterien mit Hilfe von sogenannten „Scavenging“-Proteinen wie Katalase oder Superoxid-Dismutase mittels Transkriptom- und auch Proteom-Analysen sollte in Betracht gezogen werden.

Um den *in vivo* Bedingungen einer Implantat-assoziierten Infektion näher zu kommen, wären Ko-Kultur-Systeme zwischen *S. epidermidis*, Osteoblasten und auch immunologisch relevanten Zelltypen äußerst sinnvoll. Aber auch verhältnismäßig einfache Systeme zur Untersuchung der Adhärenz- und Internalisierung von *S. epidermidis* nach Plasma-Behandlung an bzw. in z.B. Osteoblasten könnte eine erste Näherung an *in vivo* Bedingungen darstellen.

6 Zusammenfassung

Trotz weitreichender Fortschritte in der orthopädischen Chirurgie stellen bakterielle Infektionen nach chirurgischen Eingriffen weiterhin eine große Komplikation dar. Hauptauslöser für Implantat-assoziierte Infektionen in der orthopädischen Chirurgie sind Biofilm-bildende Bakterien wie *S. aureus* oder *S. epidermidis*. Neben ihrer Fähigkeit zur Biofilmbildung besitzt der Großteil der involvierten Spezies Resistenzmechanismen gegenüber Antibiotika. So führen sie häufig zu schweren Infektionsverläufen, mit längeren Krankenhausaufenthalten, komplizierten Revisionsprozeduren und in vielen Fällen zu einem vollständigen Versagen des Implantats. Techniken zur Unterbindung Biofilm-assoziiierter Infektionen umfassen u.a. den Einsatz von Antibiotika, Hitze, Druck, UV-Strahlung, antimikrobieller Nanopartikel und Peptide, Nano-strukturierter Oberflächen, aber auch von kaltem Atmosphärendruckplasma. Als vierter Aggregatzustand ist Plasma ein ionisiertes Gas, bestehend aus Atomen, angeregten Molekülen, geladenen Teilchen, reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS bzw. RNS) sowie UV-Photonen, die alle zu der beschriebenen antibakteriellen Eigenschaften von Plasma beitragen. Auf Grund der bemerkenswerten Wirksamkeit gegen eine Reihe von Mikroorganismen, einschließlich Biofilm-bildender Spezies und Sporen, stellen kalte Plasmen eine effektive Alternative zu traditionellen Antibiotika für nicht-systemische Infektionen dar.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst unterschiedliche direkte und indirekte Plasma-Quellen hinsichtlich ihres antimikrobiellen Potentials gegen Biofilme von *S. epidermidis* untersucht. Diese Untersuchungen stellten die Grundlage für alle weiterführenden Versuche dar. Lediglich für zwei indirekte Plasma-Quellen, kINPen08 und kHz-Jet, konnte eine signifikante Reduktion der Vitalität der Biofilme von *S. epidermidis* nachgewiesen werden. Für alle weiteren Versuche kam der kINPen08 auf Grund seiner einfacheren Handhabung im Vergleich zum kHz-Jet zum Einsatz.

In weiterführenden Versuchen wurde das Biofilmmodell von *S. epidermidis* auf TiAlV-Oberflächen übertragen und das antimikrobielle Potential für den kINPen08 getestet. Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Reduktion der Vitalität sowie der Biofilmmasse durch die Plasma-Behandlung auf. Weiterhin wurde eine Veränderung der Biofilm-Morphologie sowie einzelner Bakterien in den oberen Schichten der Biofilme durch die Plasma-Behandlung nachgewiesen. Da auf Grund der Ergebnisse aber keine vollständige Eliminierung des Biofilms nachweisbar war, wurden diese nach der Plasma-Behandlung erneut kultiviert, um eine potentielle Revitalisierung der Biofilme durch z.B. überlebenden Bakterien innerhalb des Biofilms oder durch Bakterien im VBNC-Status nachzuweisen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten eine deutliche Revitalisierung der Biofilme nach erneuter Kultivierung.

Durch die Ergebnisse zur Beschädigung der Biofilmmorphologie sowie der Beschädigung der Zellwand einzelner Bakterien, wurden die Plasma-behandelten Biofilme von

S. epidermidis unter Einsatz des Zellwandgängigen Antibiotikums Gentamicin kultiviert. Aus Vorversuchen konnte nachgewiesen werden, dass der verwendete Stamm *S. epidermidis* RP62A gegen Gentamicin Resistenzen ausgebildet hatte. Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen geht hervor, dass nach der Plasma-Behandlung die Sensitivität der Biofilme gegenüber Gentamicin signifikant erhöht wurde. Auch konnte durch die kombinierte Behandlung eine vollständige Reduktion der Vitalität der Biofilme nachgewiesen werden. Lediglich die Biofilmmasse blieb weiterhin auf den TiAlV-Probekörpern bestehen. In weiteren Versuchen wurde daraufhin die irreversible Schädigung der Biofilme durch die kombinierte Behandlung aus Plasma und Gentamicin untersucht. Auch hier konnte gezeigt werden, dass sich die Biofilme nach erneuter Kultivierung ohne Antibiose nicht wieder erholen konnten. So ist darauf zu schließen, dass diese Behandlung zu einer irreversiblen Schädigung der Biofilme führte.

Da sich während der Behandlung eines Biofilms immer wieder einzelne Bakterien aus den Biofilmstrukturen lösen, wurden auch diese planktonischen Bakterien nach der Plasma-Behandlung auf ihre Sensitivität gegenüber einer Antibiose getestet. Auch hier zeigte sich eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Gentamicin im Wachstumsverhalten von *S. epidermidis*. Gegen die Antibiotika Erythromycin und Ampicillin konnte hingegen keine gesteigerte Sensitivität unter den gleichen Versuchsbedingungen nachgewiesen werden.

In der gängigen Literatur werden Fälle einer reduzierten Sensitivität von Bakterien gegen eine wiederholte Plasma-Behandlung beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde auch dieses wahrscheinliche Szenario untersucht. An Hand der Ergebnisse konnte allerdings gezeigt werden, dass eine wiederholte Plasma-Behandlung von *S. epidermidis* zu einer gesteigerten Sensitivität gegenüber Plasma führte.

Zusammenfassend weisen diese *in vitro* Ergebnisse auf eine potentielle adjuvante Behandlungs-Strategie für Biofilm-assoziierte Implantat-Infektionen hin.

7 Literaturverzeichnis

- Abramzon, N.; Joaquin, J. C.; Bray, J.; Brelles-Marino, G. (2006): Biofilm Destruction by RF High-Pressure Cold Plasma Jet. In: *IEEE Trans. Plasma Sci.* 34 (4), S. 1304–1309. DOI: 10.1109/TPS.2006.877515.
- Alkawareek, Mahmoud Y.; Algwari, Qais T.; Gorman, Sean P.; Graham, William G.; O'Connell, Deborah; Gilmore, Brendan F. (2012): Application of atmospheric pressure nonthermal plasma for the *in vitro* eradication of bacterial biofilms. In: *FEMS immunology and medical microbiology* 65 (2), S. 381–384. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2012.00942.x.
- Alshraiedeh, Nida H.; Higginbotham, Sarah; Flynn, Padrig B.; Alkawareek, Mahmoud Y.; Tunney, Michael M.; Gorman, Sean P. et al. (2016): Eradication and phenotypic tolerance of *Burkholderia cenocepacia* biofilms exposed to atmospheric pressure non-thermal plasma. In: *International journal of antimicrobial agents* 47 (6), S. 446–450. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2016.03.004.
- Andersson, Dan I.; Hughes, Diarmaid (2010): Antibiotic resistance and its cost. Is it possible to reverse resistance? In: *Nature reviews. Microbiology* 8 (4), S. 260–271. DOI: 10.1038/nrmicro2319.
- Arciola, Carla Renata; Bustanji, Yasser; Conti, Matteo; Campoccia, Davide; Baldassarri, Lucilla; Samorì, Bruno; Montanaro, Lucio (2003): Staphylococcus epidermidis–fibronectin binding and its inhibition by heparin. In: *Biomaterials* 24 (18), S. 3013–3019. DOI: 10.1016/S0142-9612(03)00133-9.
- Arrecubieta, Carlos; Lee, Mei-Ho; Macey, Alistair; Foster, Timothy J.; Lowy, Franklin D. (2007): SdrF, a Staphylococcus epidermidis surface protein, binds type I collagen. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (26), S. 18767–18776. DOI: 10.1074/jbc.M610940200.
- Bagge, N.; Hentzer, M.; Andersen, J. B.; Ciofu, O.; Givskov, M.; Hoiby, N. (2004): Dynamics and Spatial Distribution of β -Lactamase Expression in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48 (4), S. 1168–1174. DOI: 10.1128/AAC.48.4.1168-1174.2004.
- Barraud, Nicolas; Hassett, Daniel J.; Hwang, Sung-Hei; Rice, Scott A.; Kjelleberg, Staffan; Webb, Jeremy S. (2006): Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Journal of bacteriology* 188 (21), S. 7344–7353. DOI: 10.1128/JB.00779-06.
- Bastos, M.; Ceotto, H.; Coelho, M.; Nascimento, J. (2009): Staphylococcal Antimicrobial Peptides. Relevant Properties and Potential Biotechnological Applications. In: *CPB* 10 (1), S. 38–61. DOI: 10.2174/138920109787048580.

- Bayliss, Danny L.; Walsh, James L.; Iza, Felipe; Shama, Gilbert; Holah, John; Kong, Michael G. (2012): Complex Responses of Microorganisms as a Community to a Flowing Atmospheric Plasma. In: *Plasma Process. Polym.* 9 (6), S. 597–611. DOI: 10.1002/ppap.201100104.
- Becker, K. H.; Kogelschatz, U.; Schoenbach, K. H.; Barker, R. J. (Hg.) (2005): Non-equilibrium air plasmas at atmospheric pressure. Bristol: Institute of Physics (Series in plasma physics).
- Ben Said, Myriam; Masahiro, Otaki; Hassen, Abdennaceur (2010): Detection of viable but non cultivable *Escherichia coli* after UV irradiation using a lytic Qbeta phage. In: *Annals of microbiology* 60 (1), S. 121–127. DOI: 10.1007/s13213-010-0017-4.
- Bourke, P.; Ziuzina, D.; Han, L.; Cullen, P. J.; Gilmore, B. F. (2017): Microbiological interactions with cold plasma. In: *Journal of applied microbiology* 123 (2), S. 308–324. DOI: 10.1111/jam.13429.
- Bowden, M. Gabriela; Chen, Wei; Singvall, Jenny; Xu, Yi; Peacock, Sharon J.; Valtulina, Viviana et al. (2005): Identification and preliminary characterization of cell-wall-anchored proteins of *Staphylococcus epidermidis*. In: *Microbiology (Reading, England)* 151 (Pt 5), S. 1453–1464. DOI: 10.1099/mic.0.27534-0.
- Bowden, M. Gabriela; Visai, Livia; Longshaw, Christopher M.; Holland, Keith T.; Speziale, Pietro; Hook, Magnus (2002): Is the GehD lipase from *Staphylococcus epidermidis* a collagen binding adhesin? In: *The Journal of biological chemistry* 277 (45), S. 43017–43023. DOI: 10.1074/jbc.M207921200.
- Boxhammer, V.; Morfill, G. E.; Jokipii, J. R.; Shimizu, T.; Klämpfl, T.; Li, Y-F et al. (2012): Bactericidal action of cold atmospheric plasma in solution. In: *New J. Phys.* 14 (11), S. 113042. DOI: 10.1088/1367-2630/14/11/113042.
- Bozic, Kevin J.; Lau, Edmund; Kurtz, Steven; Ong, Kevin; Rubash, Harry; Vail, Thomas P.; Berry, Daniel J. (2012): Patient-related risk factors for periprosthetic joint infection and post-operative mortality following total hip arthroplasty in Medicare patients. In: *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 94 (9), S. 794–800. DOI: 10.2106/JBJS.K.00072.
- Brady, Rebecca A.; Calhoun, Jason H.; Leid, Jeff G.; Shirtliff, Mark E. (2009): Infections of Orthopaedic Implants and Devices. In: Mark Shirtliff und Jeff G. Leid (Hg.): *The Role of Biofilms in Device-Related Infections*, Bd. 3. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Springer Series on Biofilms), S. 15–55.
- Brelles-Mariño, G. (2012): Induction of a viable-but-non-culturable state in bacteria treated with gas discharge plasma. In: *Journal of applied microbiology* 112 (2), 412-3; author reply 414-5. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05198.x.

- Brennan, M. P.; Loughman, A.; Devocelle, M.; Arasu, S.; Chubb, A. J.; Foster, T. J.; Cox, D. (2009): Elucidating the role of *Staphylococcus epidermidis* serine-aspartate repeat protein G in platelet activation. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 7 (8), S. 1364–1372. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03495.x.
- Brooks, Jamie L.; Jefferson, Kimberly K. (2012): Staphylococcal biofilms. Quest for the magic bullet. In: *Advances in applied microbiology* 81, S. 63–87. DOI: 10.1016/B978-0-12-394382-8.00002-2.
- Bühler, Matthias; Schmidt, Hergo; Engelhardt, Martin (2003): Septische postoperative Komplikationen. Vienna: Springer Vienna.
- Ceri, H.; Olson, M. E.; Stremick, C.; Read, R. R.; Morck, D.; Buret, A. (1999): The Calgary Biofilm Device. New technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. In: *Journal of clinical microbiology* 37 (6), S. 1771–1776.
- Chambers, H. F.; Hartman, B. J.; Tomasz, A. (1985): Increased amounts of a novel penicillin-binding protein in a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to nafcillin. In: *The Journal of clinical investigation* 76 (1), S. 325–331. DOI: 10.1172/JC1111965.
- Chelikani, P.; Fita, I.; Loewen, P. C. (2004): Diversity of structures and properties among catalases. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 61 (2), S. 192–208. DOI: 10.1007/s00018-003-3206-5.
- Chen, Kun-Hui; Tsai, Shang-Wen; Wu, Po-Kuei; Chen, Cheng-Fong; Wang, Hsin-Yi; Chen, Wei-Ming (2017): Partial component-retained two-stage reconstruction for chronic infection after uncemented total hip arthroplasty. Results of sixteen cases after five years of follow-up. In: *International orthopaedics* 41 (12), S. 2479–2486. DOI: 10.1007/s00264-017-3505-3.
- Chen, Xiao; Stewart, Philip S. (2000): Biofilm removal caused by chemical treatments. In: *Water Research* 34 (17), S. 4229–4233. DOI: 10.1016/S0043-1354(00)00187-1.
- Cherifi, S.; Byl, B.; Deplano, A.; Nonhoff, C.; Denis, O.; Hallin, M. (2013): Comparative epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* isolates from patients with catheter-related bacteremia and from healthy volunteers. In: *Journal of clinical microbiology* 51 (5), S. 1541–1547. DOI: 10.1128/JCM.03378-12.
- Christner, Martin; Franke, Gefion C.; Schommer, Nina N.; Wendt, Ulrike; Wegert, Kim; Pehle, Philip et al. (2010): The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. In: *Molecular microbiology* 75 (1), S. 187–207. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2009.06981.x.

- Coates, Rosanna; Moran, Josephine; Horsburgh, Malcolm J. (2014): Staphylococci. Colonizers and pathogens of human skin. In: *Future microbiology* 9 (1), S. 75–91. DOI: 10.2217/fmb.13.145.
- Cooper, M.; Fridman, G.; Fridman, A.; Joshi, S. G. (2010): Biological responses of *Bacillus stratosphericus* to floating electrode-dielectric barrier discharge plasma treatment. In: *Journal of applied microbiology* 109 (6), S. 2039–2048. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2010.04834.x.
- Corning, Peter A. (2002): The re-emergence of ? Emergence?: A venerable concept in search of a theory. In: *Complexity* 7 (6), S. 18–30. DOI: 10.1002/cplx.10043.
- Cos, P.; Toté, K.; Horemans, T.; Maes, L. (2010): Biofilms. An extra hurdle for effective antimicrobial therapy. In: *Current pharmaceutical design* 16 (20), S. 2279–2295.
- Costerton, J. W.; Cheng, K. J.; Geesey, G. G.; Ladd, T. I.; Nickel, J. C.; Dasgupta, M.; Marrie, T. J. (1987): Bacterial biofilms in nature and disease. In: *Annual review of microbiology* 41, S. 435–464. DOI: 10.1146/annurev.mi.41.100187.002251.
- Costerton, J. W.; Lewandowski, Z.; Caldwell, D. E.; Korber, D. R.; Lappin-Scott, H. M. (1995): Microbial biofilms. In: *Annual review of microbiology* 49, S. 711–745. DOI: 10.1146/annurev.mi.49.100195.003431.
- Costerton, J. W.; Stewart, P. S.; Greenberg, E. P. (1999): Bacterial biofilms. A common cause of persistent infections. In: *Science* 284 (5418), S. 1318–1322.
- Darouiche, Rabih O. (2004): Treatment of infections associated with surgical implants. In: *The New England journal of medicine* 350 (14), S. 1422–1429. DOI: 10.1056/NEJMra035415.
- Davey, M. E.; O'Toole, G. A. (2000): Microbial biofilms. From ecology to molecular genetics. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 64 (4), S. 847–867.
- Dawson, Clinton C.; Intapa, Chaidan; Jabra-Rizk, Mary Ann (2011): "Persisters". Survival at the cellular level. In: *PLoS pathogens* 7 (7), e1002121. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002121.
- Diekema, D. J.; Pfaller, M. A.; Schmitz, F. J.; Smayevsky, J.; Bell, J.; Jones, R. N.; Beach, M. (2001): Survey of infections due to *Staphylococcus* species. Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 32 Suppl 2, S114-32. DOI: 10.1086/320184.
- Donlan, Rodney M.; Costerton, J. William (2002): Biofilms. Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. In: *Clinical microbiology reviews* 15 (2), S. 167–193.

- Duguid, I. G.; Evans, E.; Brown, M. R.; Gilbert, P. (1992a): Effect of biofilm culture upon the susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* to tobramycin. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 30 (6), S. 803–810.
- Duguid, I. G.; Evans, E.; Brown, M. R.; Gilbert, P. (1992b): Growth-rate-independent killing by ciprofloxacin of biofilm-derived *Staphylococcus epidermidis*; evidence for cell-cycle dependency. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 30 (6), S. 791–802.
- Dunne, W. M. (1990): Effects of subinhibitory concentrations of vancomycin or cefamandole on biofilm production by coagulase-negative staphylococci. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 34 (3), S. 390–393. DOI: 10.1128/AAC.34.3.390.
- Dunne, W. M.; Mason, E. O.; Kaplan, S. L. (1993): Diffusion of rifampin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 37 (12), S. 2522–2526.
- Dunne, W. Michael (2002): Bacterial adhesion. Seen any good biofilms lately? In: *Clinical microbiology reviews* 15 (2), S. 155–166.
- Duske, Kathrin; Jablonowski, Lukasz; Koban, Ina; Matthes, Rutger; Holtfreter, Birte; Sckell, Axel et al. (2015a): Cold atmospheric plasma in combination with mechanical treatment improves osteoblast growth on biofilm covered titanium discs. In: *Biomaterials* 52, S. 327–334. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.02.035.
- Duske, Kathrin; Wegner, Katharina; Donnert, Monique; Kunert, Ulrike; Podbielski, Andreas; Kreikemeyer, Bernd et al. (2015b): Comparative In Vitro Study of Different Atmospheric Pressure Plasma Jets Concerning their Antimicrobial Potential and Cellular Reaction. In: *Plasma Process. Polym.* 12 (10), S. 1050–1060. DOI: 10.1002/ppap.201400176.
- Dwyer, Daniel J.; Camacho, Diogo M.; Kohanski, Michael A.; Callura, Jarred M.; Collins, James J. (2012): Antibiotic-induced bacterial cell death exhibits physiological and biochemical hallmarks of apoptosis. In: *Molecular cell* 46 (5), S. 561–572. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.04.027.
- Dwyer, Daniel J.; Kohanski, Michael A.; Hayete, Boris; Collins, James J. (2007): Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. In: *Molecular systems biology* 3, S. 91. DOI: 10.1038/msb4100135.
- Ehlbeck, J.; Schnabel, U.; Polak, M.; Winter, J.; Woedtke, Th von; Brandenburg, R. et al. (2011): Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination. In: *J. Phys. D: Appl. Phys.* 44 (1), S. 13002. DOI: 10.1088/0022-3727/44/1/013002.
- Ermolaeva, Svetlana A.; Varfolomeev, Alexander F.; Chernukha, Marina Yu; Yurov, Dmitry S.; Vasiliev, Mikhail M.; Kaminskaya, Anastasya A. et al. (2011): Bactericidal effects of non-

- thermal argon plasma *in vitro*, in biofilms and in the animal model of infected wounds. In: *Journal of medical microbiology* 60 (Pt 1), S. 75–83. DOI: 10.1099/jmm.0.020263-0.
- Flemming, Hans-Curt; Neu, Thomas R.; Wozniak, Daniel J. (2007): The EPS matrix. The "house of biofilm cells". In: *Journal of bacteriology* 189 (22), S. 7945–7947. DOI: 10.1128/JB.00858-07.
- Flemming, Hans-Curt; Wingender, Jost (2010): The biofilm matrix. In: *Nature reviews. Microbiology* 8 (9), S. 623–633. DOI: 10.1038/nrmicro2415.
- Flemming, Hans-Curt; Wingender, Jost; Szewzyk, Ulrich; Steinberg, Peter; Rice, Scott A.; Kjelleberg, Staffan (2016): Biofilms. An emergent form of bacterial life. In: *Nature reviews. Microbiology* 14 (9), S. 563–575. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.94.
- Flynn, Padrig B.; Higginbotham, Sarah; Alshraideh, Nid'a H.; Gorman, Sean P.; Graham, William G.; Gilmore, Brendan F. (2015): Bactericidal efficacy of atmospheric pressure non-thermal plasma (APNTP) against the ESKAPE pathogens. In: *International journal of antimicrobial agents* 46 (1), S. 101–107. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2015.02.026.
- Foster, T. (1998): Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. In: *Trends in Microbiology* 6 (12), S. 484–488. DOI: 10.1016/S0966-842X(98)01400-0.
- Frank, Daniel N.; Feazel, Leah M.; Bessesen, Mary T.; Price, Connie S.; Janoff, Edward N.; Pace, Norman R. (2010): The human nasal microbiota and *Staphylococcus aureus* carriage. In: *PloS one* 5 (5), e10598. DOI: 10.1371/journal.pone.0010598.
- Fricke, Katja; Koban, Ina; Tresp, Helena; Jablonowski, Lukasz; Schröder, Karsten; Kramer, Axel et al. (2012): Atmospheric pressure plasma. A high-performance tool for the efficient removal of biofilms. In: *PloS one* 7 (8), e42539. DOI: 10.1371/journal.pone.0042539.
- Fridman, A.; Chirokov, A.; Gutsol, A. (2005): Non-thermal atmospheric pressure discharges. In: *J. Phys. D: Appl. Phys.* 38 (2), R1-R24. DOI: 10.1088/0022-3727/38/2/R01.
- Gallagher, M. J.; Vaze, N.; Gangoli, S.; Vasilets, V. N.; Gutsol, A. F.; Milovanova, T. N. et al. (2007): Rapid Inactivation of Airborne Bacteria Using Atmospheric Pressure Dielectric Barrier Grating Discharge. In: *IEEE Trans. Plasma Sci.* 35 (5), S. 1501–1510. DOI: 10.1109/TPS.2007.905209.
- Garvin, K. L.; Hinrichs, S. H.; Urban, J. A. (1999): Emerging antibiotic-resistant bacteria. Their treatment in total joint arthroplasty. In: *Clinical orthopaedics and related research* (369), S. 110–123.
- Gaunt, L. F.; Beggs, C. B.; Georgiou, G. E. (2006): Bactericidal Action of the Reactive Species Produced by Gas-Discharge Nonthermal Plasma at Atmospheric Pressure. A Review. In: *IEEE Trans. Plasma Sci.* 34 (4), S. 1257–1269. DOI: 10.1109/TPS.2006.878381.

- Gaupp, Rosmarie; Ledala, Nagender; Somerville, Greg A. (2012): Staphylococcal response to oxidative stress. In: *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2, S. 33. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00033.
- Gerling, T.; Hoder, T.; Brandenburg, R.; Bussiahn, R.; Weltmann, K-D (2013): Influence of the capillary on the ignition of the transient spark discharge. In: *J. Phys. D: Appl. Phys.* 46 (14), S. 145205. DOI: 10.1088/0022-3727/46/14/145205.
- Geyter, N. de; Morent, R. (2012): Nonthermal plasma sterilization of living and nonliving surfaces. In: *Annual review of biomedical engineering* 14, S. 255–274. DOI: 10.1146/annurev-bioeng-071811-150110.
- Gilbert, P.; Das, J.; Foley, I. (1997): Biofilm susceptibility to antimicrobials. In: *Advances in dental research* 11 (1), S. 160–167. DOI: 10.1177/08959374970110010701.
- Gill, Steven R.; Fouts, Derrick E.; Archer, Gordon L.; Mongodin, Emmanuel F.; Deboy, Robert T.; Ravel, Jacques et al. (2005): Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. In: *Journal of bacteriology* 187 (7), S. 2426–2438. DOI: 10.1128/JB.187.7.2426-2438.2005.
- Gollwitzer, H.; Gerdesmeyer, L. (2006): Antiinfektiöse Oberflächenbeschichtung. In: *Ossäre Integration*: Springer Berlin Heidelberg, S. 62–68.
- Gristina, A. (1987): Biomaterial-centered infection. Microbial adhesion versus tissue integration. In: *Science* 237 (4822), S. 1588–1595. DOI: 10.1126/science.3629258.
- Guo, Xing-Pan; Yang, Yi; Lu, Da-Pei; Niu, Zuo-Shun; Feng, Jing-Nan; Chen, Yu-Ru et al. (2018): Biofilms as a sink for antibiotic resistance genes (ARGs) in the Yangtze Estuary. In: *Water Research* 129, S. 277–286. DOI: 10.1016/j.watres.2017.11.029.
- Haenle, M.; Skripitz, C.; Mittelmeier, W.; Skripitz, R. (2012): Ökonomische Auswirkungen infizierter Hüfttotalendoprothesen im DRG-System. In: *Der Orthopäde* 41 (6), S. 467–476. DOI: 10.1007/s00132-012-1939-2.
- Han, L.; Patil, S.; Boehm, D.; Milosavljević, V.; Cullen, P. J.; Bourke, P. (2015): Mechanisms of Inactivation by High-Voltage Atmospheric Cold Plasma Differ for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. In: *Applied and environmental microbiology* 82 (2), S. 450–458. DOI: 10.1128/AEM.02660-15.
- Harris, Llinos G.; Murray, Susan; Pascoe, Ben; Bray, James; Meric, Guillaume; Mageiros, Leonardos et al. (2016): Biofilm Morphotypes and Population Structure among *Staphylococcus epidermidis* from Commensal and Clinical Samples. In: *PloS one* 11 (3), e0151240. DOI: 10.1371/journal.pone.0151240.

- Harrison, Joe J.; Turner, Raymond J.; Ceri, Howard (2005): Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Environmental microbiology* 7 (7), S. 981–994. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2005.00777.x.
- Hartford, O.; O'Brien, L.; Schofield, K.; Wells, J.; Foster, T. J. (2001): The Fbe (SdrG) protein of *Staphylococcus epidermidis* HB promotes bacterial adherence to fibrinogen. In: *Microbiology (Reading, England)* 147 (Pt 9), S. 2545–2552. DOI: 10.1099/00221287-147-9-2545.
- Hassan, M.; Kjos, M.; Nes, I. F.; Diep, D. B.; Lotfipour, F. (2012): Natural antimicrobial peptides from bacteria. Characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. In: *Journal of applied microbiology* 113 (4), S. 723–736. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05338.x.
- He, Hong-Jing; Sun, Feng-Jun; Wang, Qian; Liu, Yao; Xiong, Li-Rong; Xia, Pei-Yuan (2016): Erythromycin resistance features and biofilm formation affected by subinhibitory erythromycin in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. In: *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi* 49 (1), S. 33–40. DOI: 10.1016/j.jmii.2014.03.001.
- Heilmann, C.; Hussain, M.; Peters, G.; Götz, F. (1997): Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. In: *Molecular microbiology* 24 (5), S. 1013–1024.
- Heilmann, Christine; Götz, Friedrich (2013): Staphylococcal Virulence Factors. In: T. Fintan Moriarty, Sebastian A.J Zaat und Henk J. Busscher (Hg.): *Biomaterials Associated Infection*. New York, NY: Springer New York, S. 57–85.
- Heilmann, Christine; Thumm, Günther; Chhatwal, Gursharan S.; Hartleib, Jörg; Uekötter, Andreas; Peters, Georg (2003): Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. In: *Microbiology (Reading, England)* 149 (Pt 10), S. 2769–2778. DOI: 10.1099/mic.0.26527-0.
- Heinlin, Julia; Morfill, Gregor; Landthaler, Michael; Stolz, Wilhelm; Isbary, Georg; Zimmermann, Julia L. et al. (2010): Plasma medicine. Possible applications in dermatology. In: *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG* 8 (12), S. 968–976. DOI: 10.1111/j.1610-0387.2010.07495.x.
- Helmke, Andreas; Hoffmeister, Dennis; Berge, Frank; Emmert, Steffen; Laspe, Petra; Mertens, Nina et al. (2011): Physical and Microbiological Characterisation of *Staphylococcus epidermidis* Inactivation by Dielectric Barrier Discharge Plasma. In: *Plasma Process. Polym.* 8 (4), S. 278–286. DOI: 10.1002/ppap.201000168.

Højby, Niels; Bjarnsholt, Thomas; Givskov, Michael; Molin, Søren; Ciofu, Oana (2010): Antibiotic resistance of bacterial biofilms. In: *International journal of antimicrobial agents* 35 (4), S. 322–332. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011.

Holinka, Johannes; Bauer, Leonhard; Hirschl, Alexander M.; Graninger, Wolfgang; Windhager, Reinhard; Prestler, Elisabeth (2011): Sonication cultures of explanted components as an add-on test to routinely conducted microbiological diagnostics improve pathogen detection. In: *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 29 (4), S. 617–622. DOI: 10.1002/jor.21286.

Hong, Y. F.; Kang, J. G.; Lee, H. Y.; Uhm, H. S.; Moon, E.; Park, Y. H. (2009): Sterilization effect of atmospheric plasma on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* endospores. In: *Letters in applied microbiology* 48 (1), S. 33–37. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2008.02480.x.

Hoyle, B. D.; Costerton, J. W. (1991): Bacterial resistance to antibiotics. The role of biofilms. In: *Progress in drug research. Fortschritte der Arzneimittelforschung. Progres des recherches pharmaceutiques* 37, S. 91–105.

Hübner, N-O; Matthes, R.; Koban, I.; Rändler, C.; Müller, G.; Bender, C. et al. (2010): Efficacy of chlorhexidine, polihexanide and tissue-tolerable plasma against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown on polystyrene and silicone materials. In: *Skin pharmacology and physiology* 23 Suppl, S. 28–34. DOI: 10.1159/000318265.

Hüfner, Alexander; Steffen, Heike; Holtfreter, Birte; Schlüter, Rabea; Duske, Kathrin; Matthes, Rutger et al. (2017): Effects of Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma and Sodium Hypochlorite Solution on *Enterococcus faecalis* Biofilm. An Investigation in Extracted Teeth. In: *Plasma Process. Polym.* 14 (3), S. 1600064. DOI: 10.1002/ppap.201600064.

Hussain, M.; Heilmann, C.; Peters, G.; Herrmann, M. (2001): Teichoic acid enhances adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to immobilized fibronectin. In: *Microbial pathogenesis* 31 (6), S. 261–270. DOI: 10.1006/mpat.2001.0469.

Ibis, Fatma; Oflaz, Hakan; Ercan, Utku Kürsat (2016): Biofilm Inactivation and Prevention on Common Implant Material Surfaces by Nonthermal DBD Plasma Treatment. In: *Plasma Med* 6 (1), S. 33–45. DOI: 10.1615/PlasmaMed.2016015846.

Idlibi, Ahmad Nour; Al-Marrawi, Fuad; Hannig, Matthias; Lehmann, Antje; Rueppell, Andre; Schindler, Axel et al. (2013): Destruction of oral biofilms formed in situ on machined titanium (Ti) surfaces by cold atmospheric plasma. In: *Biofouling* 29 (4), S. 369–379. DOI: 10.1080/08927014.2013.775255.

Iseni, S.; Schmidt-Bleker, A.; Winter, J.; Weltmann, K-D; Reuter, S. (2014): Atmospheric pressure streamer follows the turbulent argon air boundary in a MHz argon plasma jet inves-

tigated by OH-tracer PLIF spectroscopy. In: *J. Phys. D: Appl. Phys.* 47 (15), S. 152001. DOI: 10.1088/0022-3727/47/15/152001.

Iwase, Tadayuki; Uehara, Yoshio; Shinji, Hitomi; Tajima, Akiko; Seo, Hiromi; Takada, Koji et al. (2010): Staphylococcus epidermidis Esp inhibits Staphylococcus aureus biofilm formation and nasal colonization. In: *Nature* 465 (7296), S. 346–349. DOI: 10.1038/nature09074.

Izano, Era A.; Amarante, Matthew A.; Kher, William B.; Kaplan, Jeffrey B. (2008): Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms. In: *Applied and environmental microbiology* 74 (2), S. 470–476. DOI: 10.1128/AEM.02073-07.

Jefferson, Kimberly K.; Goldmann, Donald A.; Pier, Gerald B. (2005): Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through Staphylococcus aureus biofilms. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49 (6), S. 2467–2473. DOI: 10.1128/AAC.49.6.2467-2473.2005.

Joaquin, Jonathan C.; Kwan, Calvin; Abramzon, Nina; Vandervoort, Kurt; Brelles-Mariño, Graciela (2009): Is gas-discharge plasma a new solution to the old problem of biofilm inactivation? In: *Microbiology (Reading, England)* 155 (Pt 3), S. 724–732. DOI: 10.1099/mic.0.021501-0.

Joo, Hwang-Soo; Otto, Michael (2015): Mechanisms of resistance to antimicrobial peptides in staphylococci. In: *Biochimica et biophysica acta* 1848 (11 Pt B), S. 3055–3061. DOI: 10.1016/j.bbamem.2015.02.009.

Jorge, Paula; Lourenço, Anália; Pereira, Maria Olívia (2012): New trends in peptide-based anti-biofilm strategies. A review of recent achievements and bioinformatic approaches. In: *Biofouling* 28 (10), S. 1033–1061. DOI: 10.1080/08927014.2012.728210.

Joshi, Suresh G.; Cooper, Moogega; Yost, Adam; Paff, Michelle; Ercan, Utku K.; Fridman, Gregory et al. (2011): Nonthermal dielectric-barrier discharge plasma-induced inactivation involves oxidative DNA damage and membrane lipid peroxidation in Escherichia coli. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55 (3), S. 1053–1062. DOI: 10.1128/AAC.01002-10.

Kaye, Keith S.; Engemann, John J.; Fraimow, Henry S.; Abrutyn, Elias (2004): Pathogens resistant to antimicrobial agents. Epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. In: *Infectious disease clinics of North America* 18 (3), 467-511, viii. DOI: 10.1016/j.idc.2004.04.003.

Keudell, A. von; Awakowicz, P.; Benedikt, J.; Raballand, V.; Yanguas-Gil, A.; Opretzka, J. et al. (2010): Inactivation of Bacteria and Biomolecules by Low-Pressure Plasma Discharges. In: *Plasma Process. Polym.* 7 (3-4), S. 327–352. DOI: 10.1002/ppap.200900121.

- Koban, Ina; Matthes, Rutger; Hübner, Nils-Olaf; Welk, Alexander; Meisel, Peter; Holtfreter, Birte et al. (2010): Treatment of *Candida albicans* biofilms with low-temperature plasma induced by dielectric barrier discharge and atmospheric pressure plasma jet. In: *New J. Phys.* 12 (7), S. 73039. DOI: 10.1088/1367-2630/12/7/073039.
- Koebnik, R.; Locher, K. P.; van Gelder, P. (2000): Structure and function of bacterial outer membrane proteins. Barrels in a nutshell. In: *Molecular microbiology* 37 (2), S. 239–253.
- Kogelschatz, Ulrich (2003): Dielectric-Barrier Discharges: Their History, Discharge Physics, and Industrial Applications. In: *Plasma Chemistry and Plasma Processing* 23 (1), S. 1–46. DOI: 10.1023/A:1022470901385.
- Kong, M. G.; Kroesen, G.; Morfill, G.; Nosenko, T.; Shimizu, T.; van Dijk, J.; Zimmermann, J. L. (2009): Plasma medicine. An introductory review. In: *New J. Phys.* 11 (11), S. 115012. DOI: 10.1088/1367-2630/11/11/115012.
- König, C.; Schwank, S.; Blaser, J. (2001): Factors compromising antibiotic activity against biofilms of *Staphylococcus epidermidis*. In: *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 20 (1), S. 20–26.
- Kurtz, Steven M.; Lau, Edmund; Watson, Heather; Schmier, Jordana K.; Parvizi, Javad (2012): Economic burden of periprosthetic joint infection in the United States. In: *The Journal of arthroplasty* 27 (8 Suppl), 61-5.e1. DOI: 10.1016/j.arth.2012.02.022.
- Lackmann, Jan-Wilm; Bandow, Julia Elisabeth (2014): Inactivation of microbes and macromolecules by atmospheric-pressure plasma jets. In: *Applied microbiology and biotechnology* 98 (14), S. 6205–6213. DOI: 10.1007/s00253-014-5781-9.
- Lackmann, Jan-Wilm; Schneider, Simon; Edengeiser, Eugen; Jarzina, Fabian; Brinckmann, Steffen; Steinborn, Elena et al. (2013): Photons and particles emitted from cold atmospheric-pressure plasma inactivate bacteria and biomolecules independently and synergistically. In: *Journal of the Royal Society, Interface* 10 (89), S. 20130591. DOI: 10.1098/rsif.2013.0591.
- Lai, Yuping; Villaruz, Amer E.; Li, Min; Cha, David J.; Sturdevant, Daniel E.; Otto, Michael (2007): The human anionic antimicrobial peptide dermcidin induces proteolytic defence mechanisms in staphylococci. In: *Molecular microbiology* 63 (2), S. 497–506. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05540.x.
- Lamagni, Theresa; Elgohari, Suzanne; Harrington, Pauline (2015): Trends in surgical site infections following orthopaedic surgery. In: *Current opinion in infectious diseases* 28 (2), S. 125–132. DOI: 10.1097/QCO.000000000000143.

- Langmuir, Irving (1928): Oscillations in Ionized Gases. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 14 (8), S. 627–637.
- Laroussi, M. (2009): Low-Temperature Plasmas for Medicine? In: *IEEE Trans. Plasma Sci.* 37 (6), S. 714–725. DOI: 10.1109/TPS.2009.2017267.
- Laroussi, M.; Leipold, F. (2004): Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. In: *International Journal of Mass Spectrometry* 233 (1-3), S. 81–86. DOI: 10.1016/j.ijms.2003.11.016.
- Laroussi, M.; Mendis, D. A.; Rosenberg, M. (2003): Plasma interaction with microbes. In: *New J. Phys.* 5, S. 41. DOI: 10.1088/1367-2630/5/1/341.
- Lee, Kyenam; Paek, Kwang-hyun; Ju, Won-Tae; Lee, Yoenhee (2006): Sterilization of bacteria, yeast, and bacterial endospores by atmospheric-pressure cold plasma using helium and oxygen. In: *Journal of microbiology (Seoul, Korea)* 44 (3), S. 269–275.
- Lehner, B.; Witte, D.; Suda, A. J.; Weiss, S. (2009): Revisionsstrategie bei der Protheseninfektion. In: *Der Orthopade* 38 (8), S. 681–688. DOI: 10.1007/s00132-009-1434-6.
- Lerouge, S.; Fozza, A. C.; Wertheimer, M. R.; Marchand, R.; Yahia, L'H. (2000): Sterilization by Low-Pressure Plasma: The Role of Vacuum-Ultraviolet Radiation. In: *Plasmas and Polymers* 5 (1), S. 31–46. DOI: 10.1023/A:1009504209276.
- Lewis, K. (2008): Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. In: *Current topics in microbiology and immunology* 322, S. 107–131.
- Lewis, Kim (2007): Persister cells, dormancy and infectious disease. In: *Nature reviews. Microbiology* 5 (1), S. 48–56. DOI: 10.1038/nrmicro1557.
- Li, Min; Lai, Yuping; Villaruz, Amer E.; Cha, David J.; Sturdevant, Daniel E.; Otto, Michael (2007): Gram-positive three-component antimicrobial peptide-sensing system. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (22), S. 9469–9474. DOI: 10.1073/pnas.0702159104.
- Liao, Xinyu; Liu, Donghong; Xiang, Qisen; Ahn, Juhee; Chen, Shiguo; Ye, Xingqian; Ding, Tian (2017): Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes. A review. In: *Food Control* 75, S. 83–91. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.12.021.
- Lieberman, Michael A.; Lichtenberg, Allan J. (2005): Principles of plasma discharges and materials processing. 2nd ed. Hoboken, N.J: Wiley-Interscience. Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10299672>.

- Los, Renata; Sawicki, Rafal; Juda, Marek; Stankevic, Magdalena; Rybojad, Pawel; Sawicki, Marek et al. (2010): A comparative analysis of phenotypic and genotypic methods for the determination of the biofilm-forming abilities of *Staphylococcus epidermidis*. In: *FEMS Microbiology Letters* 310 (2), S. 97–103. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2010.02050.x.
- Lührmann, Anne; Matthes, Rutger; Kramer, Axel (2016): Impact of cold atmospheric pressure argon plasma on antibiotic sensitivity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains *in vitro*. In: *GMS hygiene and infection control* 11, Doc17. DOI: 10.3205/dgkh000277.
- Lunov, Oleg; Zablotskii, Vitalii; Churpita, Olexander; Jäger, Ales; Polívka, Leoš; Syková, Eva et al. (2016): The interplay between biological and physical scenarios of bacterial death induced by non-thermal plasma. In: *Biomaterials* 82, S. 71–83. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.12.027.
- Lynch, Anthony S.; Abbanat, Darren (2010): New antibiotic agents and approaches to treat biofilm-associated infections. In: *Expert opinion on therapeutic patents* 20 (10), S. 1373–1387. DOI: 10.1517/13543776.2010.505923.
- Mack, Dietrich; Davies, Angharad P.; Harris, Llinos G.; Rohde, Holger; Horstkotte, Matthias A.; Knobloch, Johannes K-M (2007): Microbial interactions in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 387 (2), S. 399–408. DOI: 10.1007/s00216-006-0745-2.
- Mah, T. F.; O'Toole, G. A. (2001): Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. In: *Trends in Microbiology* 9 (1), S. 34–39.
- Mai-Prochnow, Anne; Bradbury, Mark; Ostrikov, Kostya; Murphy, Anthony B. (2015): *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Response and Resistance to Cold Atmospheric Pressure Plasma Is Linked to the Redox-Active Molecule Phenazine. In: *PloS one* 10 (6), e0130373. DOI: 10.1371/journal.pone.0130373.
- Mai-Prochnow, Anne; Clauson, Maryse; Hong, Jungmi; Murphy, Anthony B. (2016): Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. In: *Scientific reports* 6, S. 38610. DOI: 10.1038/srep38610.
- Mai-Prochnow, Anne; Lucas-Elio, Patricia; Egan, Suhelen; Thomas, Torsten; Webb, Jeremy S.; Sanchez-Amat, Antonio; Kjelleberg, Staffan (2008): Hydrogen peroxide linked to lysine oxidase activity facilitates biofilm differentiation and dispersal in several gram-negative bacteria. In: *Journal of bacteriology* 190 (15), S. 5493–5501. DOI: 10.1128/JB.00549-08.
- Mai-Prochnow, Anne; Murphy, Anthony B.; McLean, Keith M.; Kong, Michael G.; Ostrikov, Kostya Ken (2014): Atmospheric pressure plasmas. Infection control and bacterial respons-

- es. In: *International journal of antimicrobial agents* 43 (6), S. 508–517. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2014.01.025.
- Mann, Miriam Stella; Tiede, Regina; Gavenis, Karsten; Daeschlein, Georg; Bussiahn, Rene; Weltmann, Klaus-Dieter et al. (2016): Introduction to DIN-specification 91315 based on the characterization of the plasma jet kINPen® MED. In: *Clinical Plasma Medicine* 4 (2), S. 35–45. DOI: 10.1016/j.cpme.2016.06.001.
- Marchal, F.; Robert, H.; Merbahi, N.; Fontagné-Faucher, C.; Yousfi, M.; Romain, C. E. et al. (2012): Inactivation of Gram-positive biofilms by low-temperature plasma jet at atmospheric pressure. In: *J. Phys. D: Appl. Phys.* 45 (34), S. 345202. DOI: 10.1088/0022-3727/45/34/345202.
- Mathur, Tarun; Singhal, Smita; Khan, Seema; Upadhyay, Dilip; Fatma, Tasneem; Rattan, Ashok (2005): Adverse effect of staphylococci slime on *in vitro* activity of glycopeptides. In: *Japanese journal of infectious diseases* 58 (6), S. 353–357.
- Matthes, Rutger; Bender, Claudia; Schlüter, Rabea; Koban, Ina; Bussiahn, René; Reuter, Stephan et al. (2013): Antimicrobial efficacy of two surface barrier discharges with air plasma against *in vitro* biofilms. In: *PloS one* 8 (7), e70462. DOI: 10.1371/journal.pone.0070462.
- Matthes, Rutger; Duske, Kathrin; Kebede, Tewodros Getachew; Pink, Christiane; Schlüter, Rabea; Woedtke, Thomas von et al. (2017): Osteoblast growth, after cleaning of biofilm-covered titanium discs with air-polishing and cold plasma. In: *Journal of clinical periodontology* 44 (6), S. 672–680. DOI: 10.1111/jcpe.12720.
- McCann, K. S. (2000): The diversity-stability debate. In: *Nature* 405 (6783), S. 228–233. DOI: 10.1038/35012234.
- Mendis, D. A.; Rosenberg, M.; Azam, F. (2000): A note on the possible electrostatic disruption of bacteria. In: *IEEE Trans. Plasma Sci.* 28 (4), S. 1304–1306. DOI: 10.1109/27.893321.
- Metelmann, Hans-Robert; Woedtke, Thomas von; Weltmann, Klaus-Dieter (Hg.) (2016): Plasmamedizin. Kaltplasma in der medizinischen Anwendung. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-52645-3>.
- Mingeot-Leclercq, M. P.; Glupczynski, Y.; Tulkens, P. M. (1999): Aminoglycosides. Activity and resistance. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43 (4), S. 727–737.
- Misra, N. N.; Tiwari, B. K.; Raghavarao, K. S. M. S.; Cullen, P. J. (2011): Nonthermal Plasma Inactivation of Food-Borne Pathogens. In: *Food Eng Rev* 3 (3-4), S. 159–170. DOI: 10.1007/s12393-011-9041-9.

- Montie, T. C.; Kelly-Wintenberg, K.; Roth, J. R. (2000): An overview of research using the one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP) for sterilization of surfaces and materials. In: *IEEE Trans. Plasma Sci.* 28 (1), S. 41–50. DOI: 10.1109/27.842860.
- Moreau, M.; Feuilloy, M. G. J.; Orange, N.; Brisset, J-L (2005): Lethal effect of the gliding arc discharges on *Erwinia* spp. In: *Journal of applied microbiology* 98 (5), S. 1039–1046. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2004.02535.x.
- Moreau, M.; Orange, N.; Feuilloy, M. G. J. (2008): Non-thermal plasma technologies. New tools for bio-decontamination. In: *Biotechnology advances* 26 (6), S. 610–617. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.08.001.
- Morgenstern, Mario; Post, Virginia; Erichsen, Christoph; Hungerer, Sven; Bühren, Volker; Miltz, Matthias et al. (2016): Biofilm formation increases treatment failure in *Staphylococcus epidermidis* device-related osteomyelitis of the lower extremity in human patients. In: *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 34 (11), S. 1905–1913. DOI: 10.1002/jor.23218.
- Napp, Matthias; Podewils, Sebastian von; Klare, Ingo; Haase, Hermann; Kasch, Richard; Gümbel, Denis et al. (2016): Does antibiotic resistance impair plasma susceptibility of multi-drug resistant clinical isolates of enterococci *in vitro*? In: *Gut pathogens* 8 (1), S. 41. DOI: 10.1186/s13099-016-0122-4.
- N'Diaye, Awa R.; Leclerc, Camille; Kentache, Takfarinas; Hardouin, Julie; Poc, Cecile Duclairoir; Konto-Ghiorgi, Yoan et al. (2016): Skin-bacteria communication. Involvement of the neurohormone Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) in the regulation of *Staphylococcus epidermidis* virulence. In: *Scientific reports* 6, S. 35379. DOI: 10.1038/srep35379.
- Nikaido, Hiroshi (2009): Multidrug resistance in bacteria. In: *Annual review of biochemistry* 78, S. 119–146. DOI: 10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923.
- Oliver, James D. (2005): The viable but nonculturable state in bacteria. In: *Journal of microbiology (Seoul, Korea)* 43 Spec No, S. 93–100.
- Otto, Michael (2009): *Staphylococcus epidermidis*--the 'accidental' pathogen. In: *Nature reviews. Microbiology* 7 (8), S. 555–567. DOI: 10.1038/nrmicro2182.
- Otto, Michael (2012): Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. In: *Seminars in immunopathology* 34 (2), S. 201–214. DOI: 10.1007/s00281-011-0296-2.
- Otto, Michael (2014): Phenol-soluble modulins. In: *International journal of medical microbiology : IJMM* 304 (2), S. 164–169. DOI: 10.1016/j.ijmm.2013.11.019.

- Pandit, Santosh; VRSS, Mokkapati; Helgadottir, Saga Huld; Westerlund, Fredrik; Mijakovic, Ivan (2017): Combination of Cold Atmospheric Plasma and Vitamin C Effectively Disrupts Bacterial Biofilms. In: *Clin Microbiol* 06 (03). DOI: 10.4172/2327-5073.1000283.
- Park, Bonggoo; Iwase, Tadayuki; Liu, George Y. (2011): Intranasal application of *S. epidermidis* prevents colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in mice. In: *PloS one* 6 (10), e25880. DOI: 10.1371/journal.pone.0025880.
- Park, Ji Hoon; Kumar, Naresh; Park, Dae Hoon; Yusupov, Maksudbek; Neyts, Erik C.; Verlackt, Christof C. W. et al. (2015): A comparative study for the inactivation of multidrug resistance bacteria using dielectric barrier discharge and nano-second pulsed plasma. In: *Scientific reports* 5, S. 13849. DOI: 10.1038/srep13849.
- Patel, Robin (2005): Biofilms and antimicrobial resistance. In: *Clinical orthopaedics and related research* (437), S. 41–47.
- Patenge, N.; Arndt, K.; Eggert, T.; Zietz, C.; Kreikemeyer, B.; Bader, R. et al. (2012): Evaluation of antimicrobial effects of novel implant materials by testing the prevention of biofilm formation using a simple small scale medium-throughput growth inhibition assay. In: *Biofouling* 28 (3), S. 267–277. DOI: 10.1080/08927014.2012.671305.
- Pei, X.; Lu, X.; Liu, J.; Liu, D.; Yang, Y.; Ostrikov, K. et al. (2012): Inactivation of a 25.5 µm *Enterococcus faecalis* biofilm by a room-temperature, battery-operated, handheld air plasma jet. In: *J. Phys. D: Appl. Phys.* 45 (16), S. 165205. DOI: 10.1088/0022-3727/45/16/165205.
- Permin, H.; Koch, C.; Høiby, N.; Christensen, H. O.; Møller, A. F.; Møller, S. (1983): Ceftazidime treatment of chronic *Pseudomonas aeruginosa* respiratory tract infection in cystic fibrosis. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 12 Suppl A, S. 313–323.
- Picioreanu, C.; van Loosdrecht, M. C.; Heijnen, J. J. (2000a): A theoretical study on the effect of surface roughness on mass transport and transformation in biofilms. In: *Biotechnology and bioengineering* 68 (4), S. 355–369.
- Picioreanu, C.; van Loosdrecht, M. C.; Heijnen, J. J. (2000b): Effect of diffusive and convective substrate transport on biofilm structure formation. A two-dimensional modeling study. In: *Biotechnology and bioengineering* 69 (5), S. 504–515.
- Pinto, Daniela; Santos, Mário A.; Chambel, Lélia (2015): Thirty years of viable but nonculturable state research. Unsolved molecular mechanisms. In: *Critical reviews in microbiology* 41 (1), S. 61–76. DOI: 10.3109/1040841X.2013.794127.
- Pulido, Luis; Ghanem, Elie; Joshi, Ashish; Purtill, James J.; Parvizi, Javad (2008): Periprosthetic joint infection. The incidence, timing, and predisposing factors. In: *Clinical orthopaedics and related research* 466 (7), S. 1710–1715. DOI: 10.1007/s11999-008-0209-4.

- Rachid, S.; Ohlsen, K.; Witte, W.; Hacker, J.; Ziebuhr, W. (2000): Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 44 (12), S. 3357–3363.
- Regis, Dario; Sandri, Andrea; Samaila, Elena; Benini, Anna; Bondi, Manuel; Magnan, Bruno (2013): Release of gentamicin and vancomycin from preformed spacers in infected total hip arthroplasties. Measurement of concentrations and inhibitory activity in patients' drainage fluids and serum. In: *TheScientificWorldJournal* 2013, S. 752184. DOI: 10.1155/2013/752184.
- Roberts, Adam P.; Pratten, Jonathan; Wilson, Michael; Mullany, Peter (1999): Transfer of a conjugative transposon, Tn 5397 in a model oral biofilm. In: *FEMS Microbiology Letters* 177 (1), S. 63–66. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13714.x.
- Rodríguez-Martínez, José M.; Ballesta, Sofía; García, Isabel; Conejo, M. Carmen; Pascual, Alvaro (2007): Actividad y permeabilidad de linezolid y vancomicina en biocapas de *Staphylococcus epidermidis*. In: *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica* 25 (7), S. 425–428.
- Rogers, H. J.; Perkins, H. R.; Ward, J. B. (1980): Ultrastructure of bacterial envelopes. In: H. J. Rogers, H. R. Perkins und J. B. Ward (Hg.): *Microbial Cell Walls and Membranes*. Dordrecht: Springer Netherlands, S. 1–44.
- Rohde, Holger; Burdelski, Christoph; Bartscht, Katrin; Hussain, Muzaffar; Buck, Friedrich; Horstkotte, Matthias A. et al. (2005): Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. In: *Molecular microbiology* 55 (6), S. 1883–1895. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04515.x.
- Rothfuss, Oliver; Gasser, Thomas; Patenge, Nadja (2010): Analysis of differential DNA damage in the mitochondrial genome employing a semi-long run real-time PCR approach. In: *Nucleic acids research* 38 (4), e24. DOI: 10.1093/nar/gkp1082.
- Rowan, N. J.; Espie, S.; Harrower, J.; Farrell, H.; Marsili, L.; Anderson, J. G.; MacGregor, S. J. (2008): Evidence of lethal and sublethal injury in food-borne bacterial pathogens exposed to high-intensity pulsed-plasma gas discharges. In: *Letters in applied microbiology* 46 (1), S. 80–86. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02268.x.
- Rupf, Stefan; Idlibi, Ahmad Nour; Marrawi, Fuad Al; Hannig, Matthias; Schubert, Andreas; Mueller, Lutz von et al. (2011): Removing biofilms from microstructured titanium ex vivo. A novel approach using atmospheric plasma technology. In: *PloS one* 6 (10), e25893. DOI: 10.1371/journal.pone.0025893.

- Sabaté Brescó, Marina; Harris, Llinos G.; Thompson, Keith; Stanic, Barbara; Morgenstern, Mario; O'Mahony, Liam et al. (2017): Pathogenic Mechanisms and Host Interactions in Staphylococcus epidermidis Device-Related Infection. In: *Frontiers in microbiology* 8, S. 1401. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01401.
- Sale, A.; Hamilton, W. (1967): Effects of high electric fields on microorganisms. Killing of bacteria and yeasts. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 148 (3), S. 781–788. DOI: 10.1016/0304-4165(67)90052-9.
- Salgueiro, Vivian Carolina; Iorio, Natalia Lopes Pontes; Ferreira, Marcelle Cristina; Chamon, Raiane Cardoso; Dos Santos, Kátia Regina Netto (2017): Methicillin resistance and virulence genes in invasive and nasal Staphylococcus epidermidis isolates from neonates. In: *BMC microbiology* 17 (1), S. 15. DOI: 10.1186/s12866-017-0930-9.
- Schäfer, Peter; Fink, Bernd; Sandow, Dieter; Margull, Andreas; Berger, Irina; Frommelt, Lars (2008): Prolonged bacterial culture to identify late periprosthetic joint infection. A promising strategy. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 47 (11), S. 1403–1409. DOI: 10.1086/592973.
- Schneider, S.; Lackmann, J-W; Narberhaus, F.; Bandow, J. E.; Denis, B.; Benedikt, J. (2011): Separation of VUV/UV photons and reactive particles in the effluent of a He/O₂ atmospheric pressure plasma jet. In: *J. Phys. D: Appl. Phys.* 44 (29), S. 295201. DOI: 10.1088/0022-3727/44/29/295201.
- Scholtz, Vladimir; Pazlarova, Jarmila; Souskova, Hana; Khun, Josef; Julak, Jaroslav (2015): Nonthermal plasma--A tool for decontamination and disinfection. In: *Biotechnology advances* 33 (6 Pt 2), S. 1108–1119. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.01.002.
- Shen, Yang; Köller, Thomas; Kreikemeyer, Bernd; Nelson, Daniel C. (2013): Rapid degradation of Streptococcus pyogenes biofilms by PlyC, a bacteriophage-encoded endolysin. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 68 (8), S. 1818–1824. DOI: 10.1093/jac/dkt104.
- Simpson, J. A.; Smith, S. E.; Dean, R. T. (1989): Scavenging by alginate of free radicals released by macrophages. In: *Free radical biology & medicine* 6 (4), S. 347–353.
- Singer, Steven W.; Erickson, Brian K.; VerBerkmoes, Nathan C.; Hwang, Mona; Shah, Manesh B.; Hettich, Robert L. et al. (2010): Posttranslational modification and sequence variation of redox-active proteins correlate with biofilm life cycle in natural microbial communities. In: *The ISME journal* 4 (11), S. 1398–1409. DOI: 10.1038/ismej.2010.64.
- Sladek, R. E. J.; Filoche, S. K.; Sissons, C. H.; Stoffels, E. (2007): Treatment of Streptococcus mutans biofilms with a nonthermal atmospheric plasma. In: *Letters in applied microbiology* 45 (3), S. 318–323. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02194.x.

- Souli, M.; Giamarellou, H. (1998): Effects of slime produced by clinical isolates of coagulase-negative staphylococci on activities of various antimicrobial agents. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 42 (4), S. 939–941.
- Spellberg, Brad; Guidos, Robert; Gilbert, David; Bradley, John; Boucher, Helen W.; Scheld, W. Michael et al. (2008): The epidemic of antibiotic-resistant infections. A call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 46 (2), S. 155–164. DOI: 10.1086/524891.
- Statistisches Bundesamt (Destatis) (2017): Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik) Operationen und Prozeduren der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern (4-Steller). Hg. v. Statistisches Bundesamt (Destatis).
- Stewart, P. S.; Costerton, J. W. (2001): Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. In: *Lancet (London, England)* 358 (9276), S. 135–138.
- Stewart, Philip S. (2002): Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. In: *International journal of medical microbiology : IJMM* 292 (2), S. 107–113. DOI: 10.1078/1438-4221-00196.
- Stoffels, Eva; Sakiyama, Yukinori; Graves, David B. (2008): Cold Atmospheric Plasma. Charged Species and Their Interactions With Cells and Tissues. In: *IEEE Trans. Plasma Sci.* 36 (4), S. 1441–1457. DOI: 10.1109/TPS.2008.2001084.
- Stoodley, P.; Sauer, K.; Davies, D. G.; Costerton, J. W. (2002): Biofilms as complex differentiated communities. In: *Annual review of microbiology* 56, S. 187–209. DOI: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160705.
- Sullivan, Sean B.; Kamath, Suneel; McConville, Thomas H.; Gray, Brett T.; Lowy, Franklin D.; Gordon, Peter G.; Uhlemann, Anne-Catrin (2016): Staphylococcus epidermidis Protection Against Staphylococcus aureus Colonization in People Living With Human Immunodeficiency Virus in an Inner-City Outpatient Population. A Cross-Sectional Study. In: *Open forum infectious diseases* 3 (4), ofw234. DOI: 10.1093/ofid/ofw234.
- Sureshkumar, A.; Sankar, R.; Mandal, Mahitosh; Neogi, Sudarsan (2010): Effective bacterial inactivation using low temperature radio frequency plasma. In: *International journal of pharmacetics* 396 (1-2), S. 17–22. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.05.045.
- Taher, F.; Assadian, O.; Hirsch, K.; Falkensammer, J.; Senekowitsch, C.; Assadian, A. (2015): Protheseninfektionen im aortofemorale Bereich und ihre Vermeidung. In: *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* 86 (3), S. 293–302. DOI: 10.1007/s00104-015-3009-x.

- Tenson, Tanel; Lovmar, Martin; Ehrenberg, Måns (2003): The Mechanism of Action of Macrolides, Lincosamides and Streptogramin B Reveals the Nascent Peptide Exit Path in the Ribosome. In: *Journal of Molecular Biology* 330 (5), S. 1005–1014. DOI: 10.1016/S0022-2836(03)00662-4.
- Thomas, Flint O.; Corke, Thomas C.; Iqbal, Muhammad; Kozlov, Alexey; Schatzman, David (2009): Optimization of Dielectric Barrier Discharge Plasma Actuators for Active Aerodynamic Flow Control. In: *AIAA Journal* 47 (9), S. 2169–2178. DOI: 10.2514/1.41588.
- Tormo, M. Angeles; Knecht, Erwin; Götz, Friedrich; Lasa, Iñigo; Penadés, José R. (2005a): Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*. Evidence of horizontal gene transfer? In: *Microbiology (Reading, England)* 151 (Pt 7), S. 2465–2475. DOI: 10.1099/mic.0.27865-0.
- Tormo, María Angeles; Martí, Miguel; Valle, Jaione; Manna, Adhar C.; Cheung, Ambrose L.; Lasa, Iñigo; Penadés, José R. (2005b): SarA is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. In: *Journal of bacteriology* 187 (7), S. 2348–2356. DOI: 10.1128/JB.187.7.2348-2356.2005.
- Traba, Christian; Chen, Long; Liang, Danni; Azzam, Robin; Liang, Jun F. (2013): Insights into discharge argon-mediated biofilm inactivation. In: *Biofouling* 29 (10), S. 1205–1213. DOI: 10.1080/08927014.2013.832222.
- Traba, Christian; Liang, Jun F. (2011): Susceptibility of *Staphylococcus aureus* biofilms to reactive discharge gases. In: *Biofouling* 27 (7), S. 763–772. DOI: 10.1080/08927014.2011.602188.
- Traba, Christian; Liang, Jun F. (2015): The inactivation of *Staphylococcus aureus* biofilms using low-power argon plasma in a layer-by-layer approach. In: *Biofouling* 31 (1), S. 39–48. DOI: 10.1080/08927014.2014.995643.
- Trevors, J. T. (2011): Viable but non-culturable (VBNC) bacteria. Gene expression in planktonic and biofilm cells. In: *Journal of microbiological methods* 86 (2), S. 266–273. DOI: 10.1016/j.mimet.2011.04.018.
- Tsukayama, D. T.; Estrada, R.; Gustilo, R. B. (1996): Infection after total hip arthroplasty. A study of the treatment of one hundred and six infections. In: *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 78 (4), S. 512–523.
- Vacheethasane, Katanchalee; Temenoff, Johnna S.; Higashi, Julie M.; Gary, Anne; Anderson, James M.; Bayston, Roger; Marchant, Roger E. (1998): Bacterial surface properties of clinically isolated *Staphylococcus epidermidis* strains determine adhesion on polyethylene. In:

Journal of biomedical materials research 42 (3), S. 425–432. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4636(19981205)42:3<425::AID-JBM12>3.0.CO;2-F.

Vandervoort, K. G.; Abramzon, N.; Brelles-Marino, G. (2008): Plasma Interactions With Bacterial Biofilms as Visualized Through Atomic Force Microscopy. In: *IEEE Trans. Plasma Sci.* 36 (4), S. 1296–1297. DOI: 10.1109/TPS.2008.917953.

Vatansever, Fatma; Melo, Wanessa C. M. A. de; Avci, Pinar; Vecchio, Daniela; Sadasivam, Magesh; Gupta, Asheesh et al. (2013): Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species--bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. In: *FEMS microbiology reviews* 37 (6), S. 955–989. DOI: 10.1111/1574-6976.12026.

Veenstra, G. J.; Cremers, F. F.; van Dijk, H.; Fleer, A. (1996): Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. In: *Journal of bacteriology* 178 (2), S. 537–541. DOI: 10.1128/jb.178.2.537-541.1996.

Vertes, Akos; Hitchins, Victoria; Phillips, K. Scott (2012): Analytical challenges of microbial biofilms on medical devices. In: *Analytical chemistry* 84 (9), S. 3858–3866. DOI: 10.1021/ac2029997.

Vickery, K.; Pajkos, A.; Cossart, Y. (2000): Evaluation of the effectiveness of decontamination of dental syringes. In: *British dental journal* 189 (11), S. 620–624.

Vollmer, Waldemar; Blanot, Didier; Pedro, Miguel A. de (2008): Peptidoglycan structure and architecture. In: *FEMS microbiology reviews* 32 (2), S. 149–167. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x.

Vuong, Cuong; Gerke, Christiane; Somerville, Greg A.; Fischer, Elizabeth R.; Otto, Michael (2003): Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. In: *The Journal of infectious diseases* 188 (5), S. 706–718. DOI: 10.1086/377239.

Vuong, Cuong; Kocianova, Stanislava; Voyich, Jovanka M.; Yao, Yufeng; Fischer, Elizabeth R.; DeLeo, Frank R.; Otto, Michael (2004a): A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (52), S. 54881–54886. DOI: 10.1074/jbc.M411374200.

Vuong, Cuong; Voyich, Jovanka M.; Fischer, Elizabeth R.; Braughton, Kevin R.; Whitney, Adeline R.; DeLeo, Frank R.; Otto, Michael (2004b): Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. In: *Cell Microbiol* 6 (3), S. 269–275. DOI: 10.1046/j.1462-5822.2004.00367.x.

Wang, Qian; Sun, Feng-Jun; Liu, Yao; Xiong, Li-Rong; Xie, Lin-Li; Xia, Pei-Yuan (2010): Enhancement of biofilm formation by subinhibitory concentrations of macrolides in *icaADBC*-

- positive and -negative clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54 (6), S. 2707–2711. DOI: 10.1128/AAC.01565-09.
- Wang, Rong; Khan, Burhan A.; Cheung, Gordon Y. C.; Bach, Thanh-Huy L.; Jameson-Lee, Max; Kong, Kok-Fai et al. (2011): *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. In: *The Journal of clinical investigation* 121 (1), S. 238–248. DOI: 10.1172/JCI42520.
- Weltmann, K.-D.; Kindel, E.; Brandenburg, R.; Meyer, C.; Bussiahn, R.; Wilke, C.; Woedtke, T. von (2009): Atmospheric Pressure Plasma Jet for Medical Therapy. Plasma Parameters and Risk Estimation. In: *Contrib. Plasma Phys.* 49 (9), S. 631–640. DOI: 10.1002/ctpp.200910067.
- Weltmann, K.-D.; Metelmann, H.-R.; Woedtke, Th. von (2016): Low temperature plasma applications in medicine. In: *Europhysics News* 47 (5-6), S. 39–42. DOI: 10.1051/eprn/2016507.
- Whitehead, Kathryn A.; Colligon, John; Verran, Joanna (2005): Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions. In: *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 41 (2-3), S. 129–138. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2004.11.010.
- Williams, R. J.; Henderson, B.; Sharp, L. J.; Nair, S. P. (2002): Identification of a Fibronectin-Binding Protein from *Staphylococcus epidermidis*. In: *Infection and Immunity* 70 (12), S. 6805–6810. DOI: 10.1128/IAI.70.12.6805-6810.2002.
- Wimpenny, Julian W.T.; Colasanti, Ric (1997): A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automaton models. In: *FEMS Microbiology Ecology* 22 (1), S. 1–16. DOI: 10.1111/j.1574-6941.1997.tb00351.x.
- Wingender, Jost; Neu, Thomas R.; Flemming, Hans-Curt (Hg.) (1999): *Microbial Extracellular Polymeric Substances. Characterization, Structure and Function*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-60147-7>.
- Winter, Theresa; Bernhardt, Jörg; Winter, Jörn; Mäder, Ulrike; Schlüter, Rabea; Weltmann, Klaus-Dieter et al. (2013): Common versus noble *Bacillus subtilis* differentially responds to air and argon gas plasma. In: *Proteomics* 13 (17), S. 2608–2621. DOI: 10.1002/pmic.201200343.
- Winter, Theresa; Winter, Jörn; Polak, Martin; Kusch, Kathrin; Mäder, Ulrike; Sietmann, Rabea et al. (2011): Characterization of the global impact of low temperature gas plasma on vegetative microorganisms. In: *Proteomics* 11 (17), S. 3518–3530. DOI: 10.1002/pmic.201000637.
- Woedtke, Th. von; Reuter, S.; Masur, K.; Weltmann, K.-D. (2013): Plasmas for medicine. In: *Physics Reports* 530 (4), S. 291–320. DOI: 10.1016/j.physrep.2013.05.005.

- Wu, Haiyan; Sun, Peng; Feng, Hongqing; Zhou, Haixia; Wang, Ruexue; Liang, Yongdong et al. (2012): Reactive Oxygen Species in a Non-thermal Plasma Microjet and Water System. Generation, Conversion, and Contributions to Bacteria Inactivation-An Analysis by Electron Spin Resonance Spectroscopy. In: *Plasma Process. Polym.* 9 (4), S. 417–424. DOI: 10.1002/ppap.201100065.
- Wu, Julie A.; Kusuma, Caroline; Mond, James J.; Kokai-Kun, John F. (2003): Lysostaphin disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms on artificial surfaces. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47 (11), S. 3407–3414.
- Wu, Yong; Zitelli, Joseph P.; TenHuisen, Kevor S.; Yu, Xiaojun; Libera, Matthew R. (2011): Differential response of *Staphylococci* and osteoblasts to varying titanium surface roughness. In: *Biomaterials* 32 (4), S. 951–960. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.10.001.
- Xu, K. D.; McFeters, G. A.; Stewart, P. S. (2000): Biofilm resistance to antimicrobial agents. In: *Microbiology (Reading, England)* 146 (Pt 3), S. 547–549. DOI: 10.1099/00221287-146-3-547.
- Xu, Zimu; Shen, Jie; Cheng, Cheng; Hu, Shuheng; Lan, Yan; Chu, Paul K. (2017): In vitro antimicrobial effects and mechanism of atmospheric-pressure He/O₂ plasma jet on *Staphylococcus aureus* biofilm. In: *J. Phys. D: Appl. Phys.* 50 (10), S. 105201. DOI: 10.1088/1361-6463/aa593f.
- Zhang, Ming; Oh, Jun Kyun; Cisneros-Zevallos, Luis; Akbulut, Mustafa (2013): Bactericidal effects of nonthermal low-pressure oxygen plasma on *S. typhimurium* LT2 attached to fresh produce surfaces. In: *Journal of Food Engineering* 119 (3), S. 425–432. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2013.05.045.
- Zimmerli, W. (2015): Orthopädische implantatassoziierte Infektionen. Update zur Antibiotikatherapie. In: *Der Orthopäde* 44 (12), S. 961–966. DOI: 10.1007/s00132-015-3184-y.
- Zimmerli, Werner; Moser, Claus (2012): Pathogenesis and treatment concepts of orthopaedic biofilm infections. In: *FEMS immunology and medical microbiology* 65 (2), S. 158–168. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2012.00938.x.
- Zimmermann, J. L.; Shimizu, T.; Schmidt, H-U; Li, Y-F; Morfill, G. E.; Isbary, G. (2012): Test for bacterial resistance build-up against plasma treatment. In: *New J. Phys.* 14 (7), S. 73037. DOI: 10.1088/1367-2630/14/7/073037.
- Zimmermann, U.; Pilwat, G.; Bresgen, D. (1980): Dielectric breakdown of cell membranes. In: *Biophys. Struct. Mechanism* 6 (S1), S. 113. DOI: 10.1007/BF00647585.

7. Anhang

7.1. Abbildungen

Abbildung 32: Kontrolle TiAlV.

Abbildung 33: Plasma 1 min.

Abbildung 34: Plasma 3 min.

Abbildung 35: Gasgemisch 1 min.

Abbildung 36: Gasgemisch 3 min.

Abbildung 37: Revitalisierung nach Plasma 1 min.

Abbildung 38: Revitalisierung nach Plasma 3 min.

Abbildung 39: Revitalisierung nach Gasgemisch 1 min.

Abbildung 40: Revitalisierung nach Gasgemisch 3 min.

Abbildung 41: Plasma 1 min und Kultivierung mit Gentamicin.

Abbildung 42: Plasma 3 min und Kultivierung mit Gentamicin.

Abbildung 43: Revitalisierung Plasma 1 min und Kultivierung mit Gentamicin.

Abbildung 44: Revitalisierung Plasma 3 min und Kultivierung mit Gentamicin.

Abbildung 45: Revitalisierung Gasgemisch 1 min und Kultivierung mit Gentamicin.

Abbildung 46: Revitalisierung Gasgemisch 3 min und Kultivierung mit Gentamicin.

Abbildung 48: Wachstumskinetiken nach Plasma-bzw. Gas-Exposition

Abbildung 49: Wachstumskinetiken nach Plasma-bzw. Gas-Exposition

Abbildung 50: Wachstumskinetiken nach Plasma-bzw. Gas-Exposition

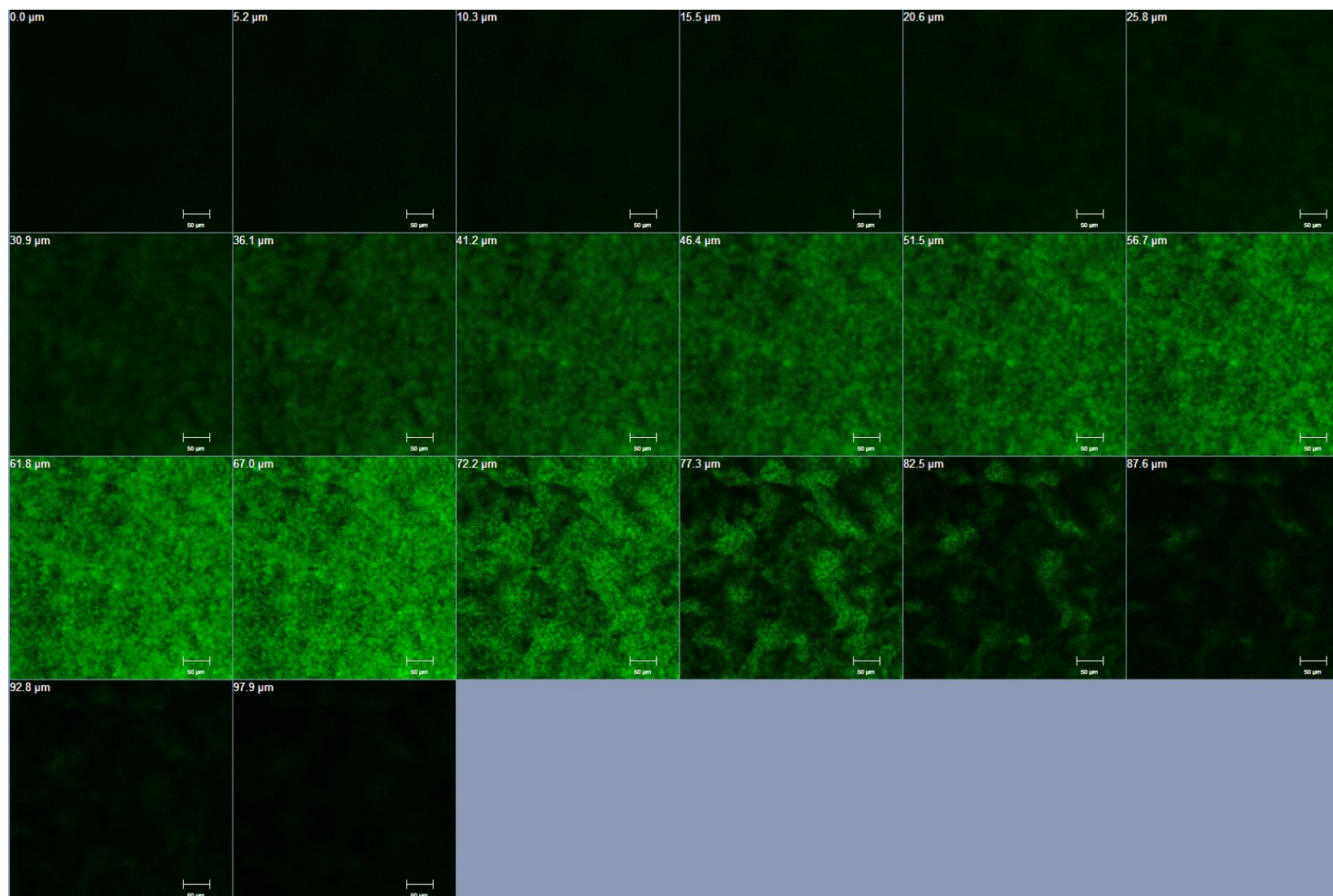


Abbildung 32: Kontrolle TiAIV. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach Lebend-Tot-Färbung mittels CLSM (Serienaufnahme Fokusebenen im Abstand von 5,2 µm). Vergrößerung 200-fach.

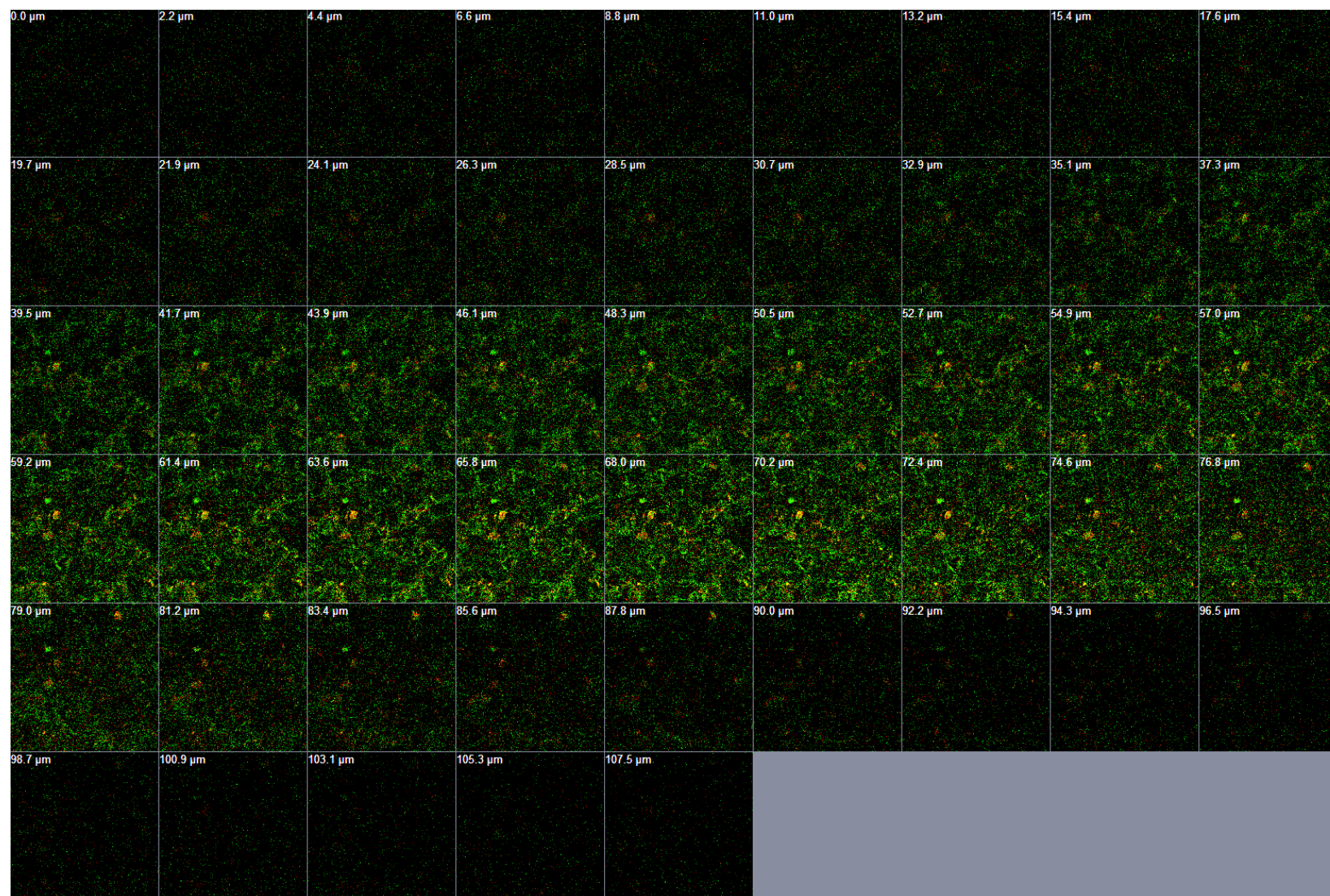


Abbildung 33: Plasma 1 min. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach Lebend-Tot-Färbung mittels CLSM (Serienaufnahme Fokusebenen im Abstand von 2,2 µm). Vergrößerung 200-fach.

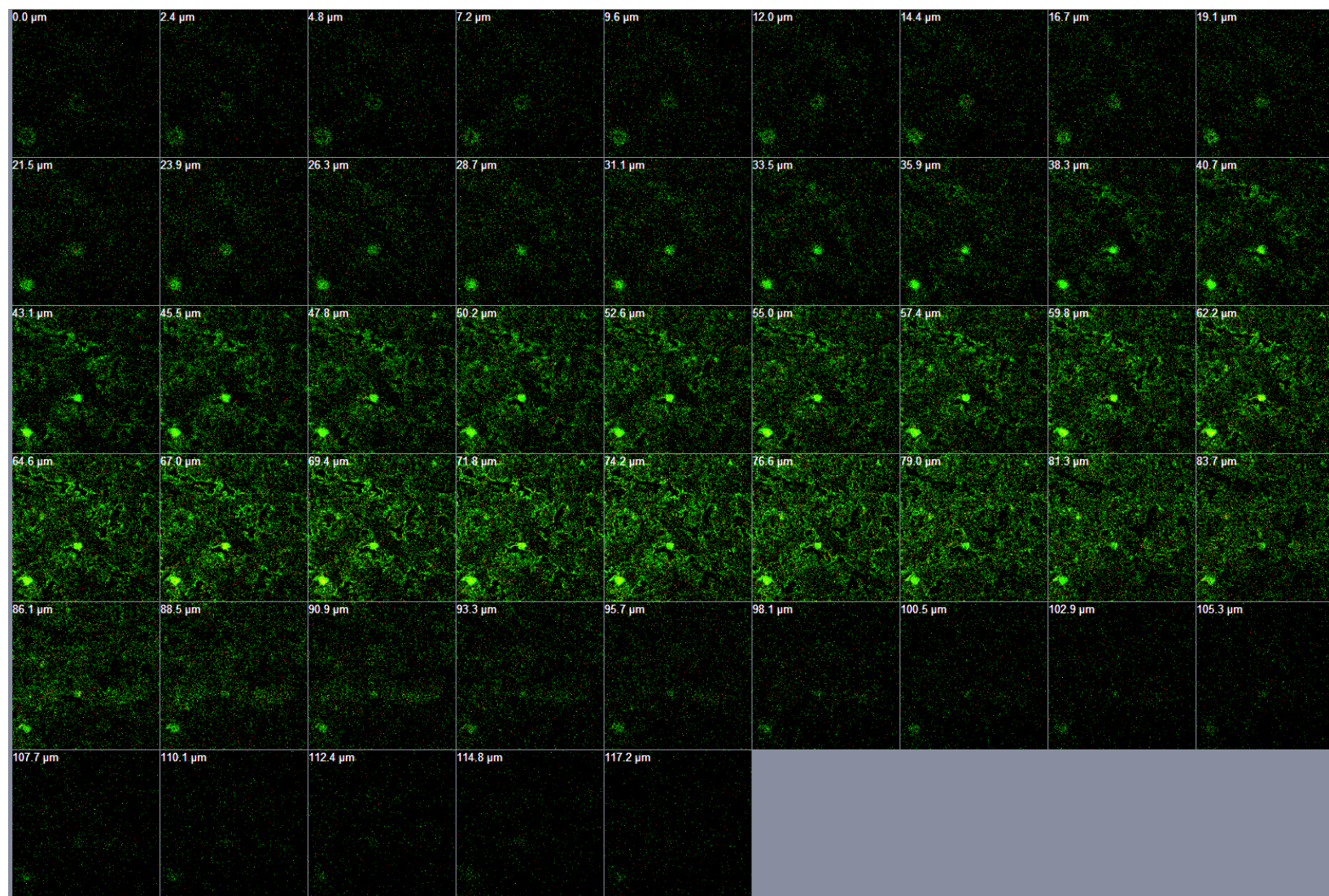


Abbildung 34: Plasma 3 min. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach Lebend-Tot-Färbung mittels CLSM (Serienaufnahme Fokusebenen im Abstand von 2,3 µm). Vergrößerung 200-fach.

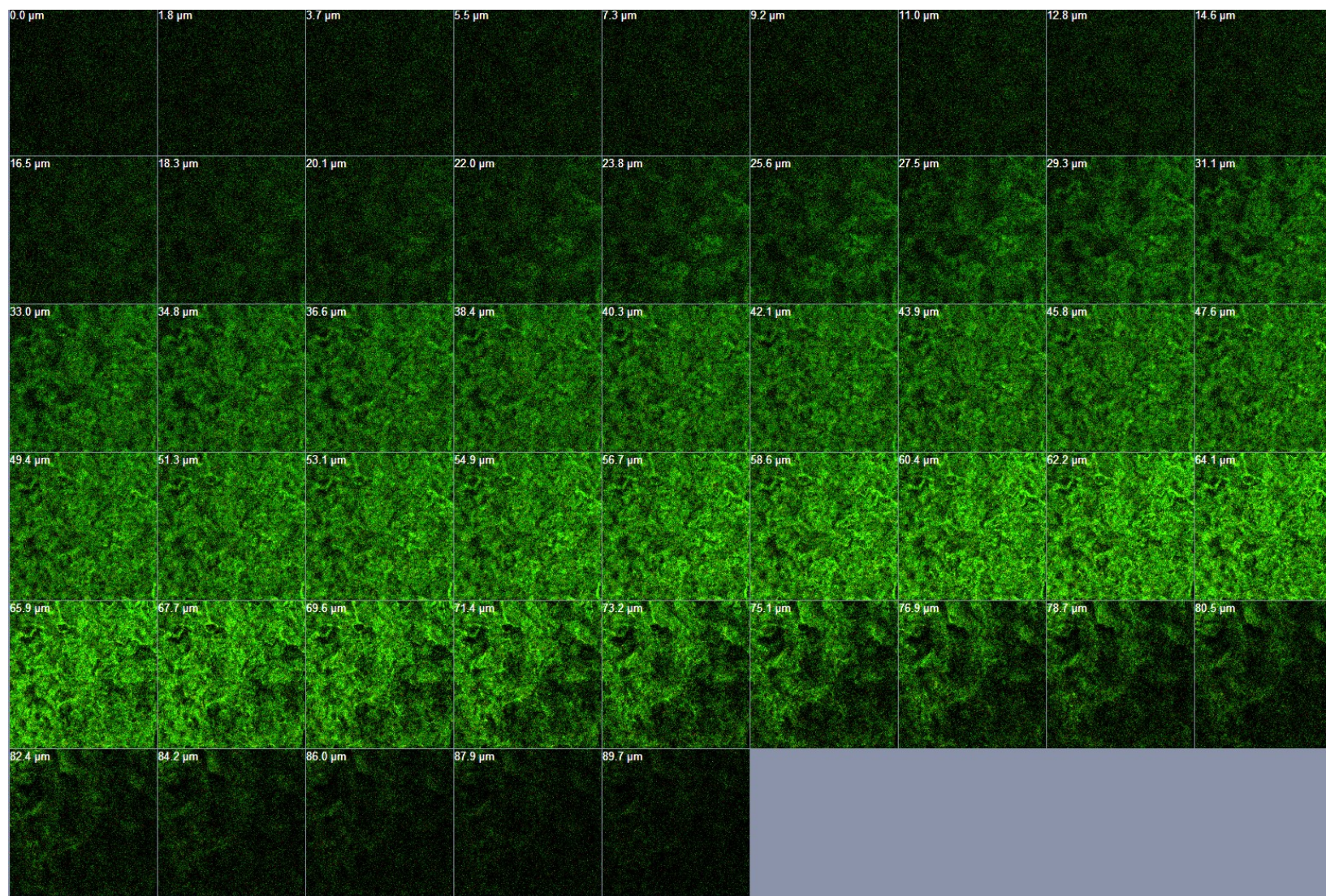


Abbildung 35: Gasgemisch 1 min. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach Lebend-Tot-Färbung mittels CLSM (Serienaufnahme Fokusebenen im Abstand von 1,8 µm). Vergrößerung 200-fach.

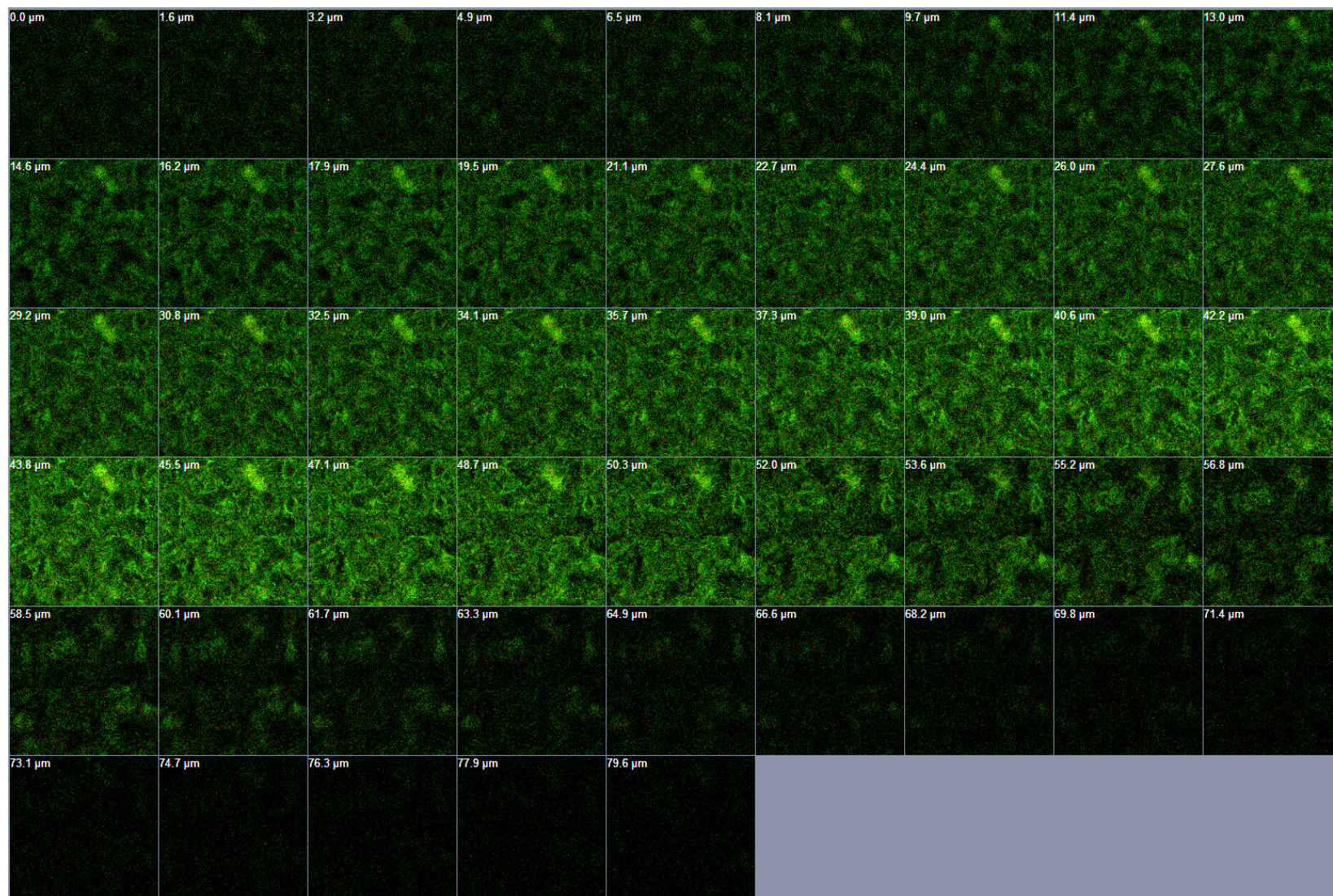


Abbildung 36: Gasgemisch 3 min. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach Lebend-Tot-Färbung mittels CLSM (Serienaufnahme Fokusebenen im Abstand von 1,6 µm).

Vergrößerung

200-fach.

XXXIX

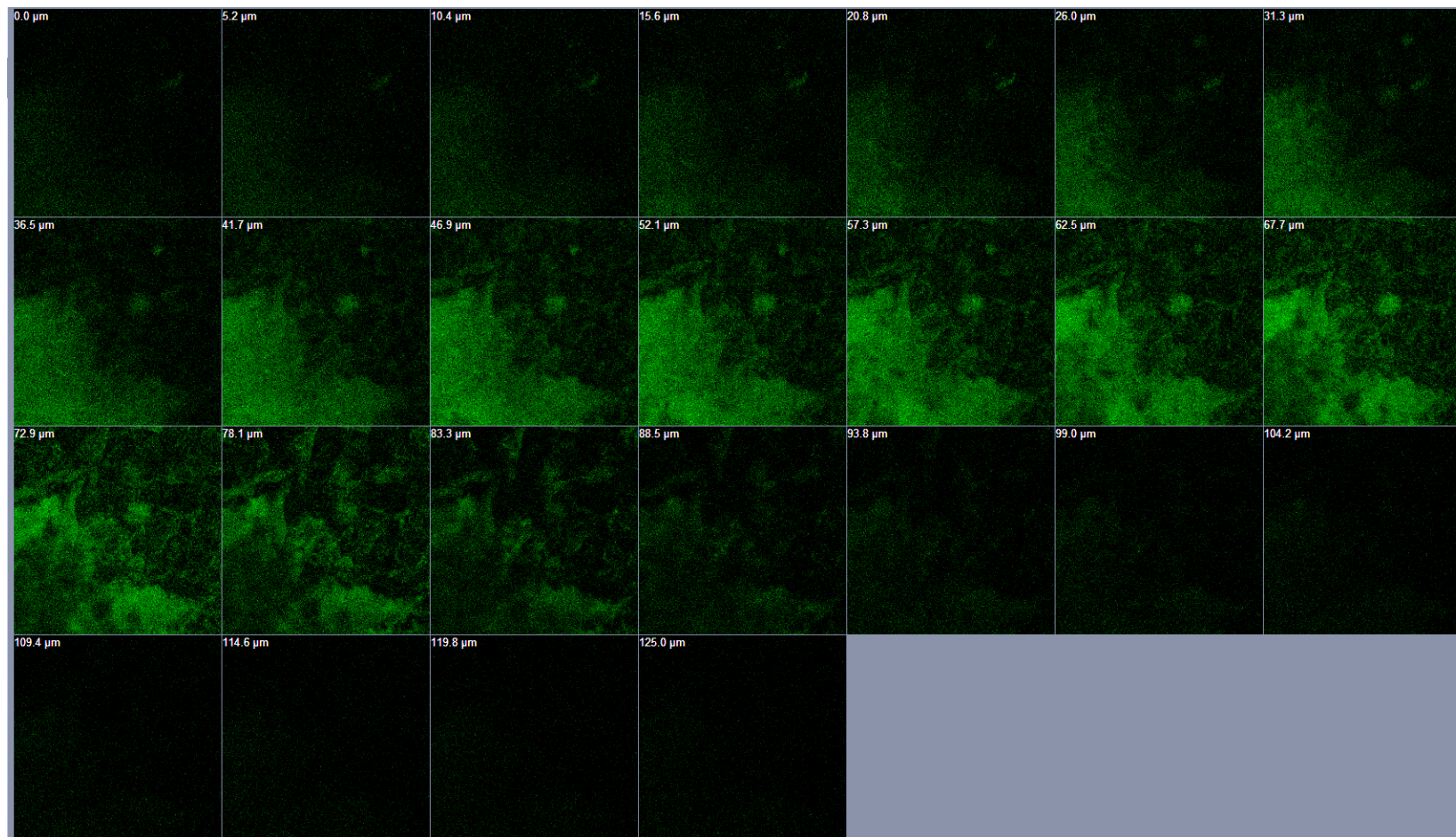


Abbildung 37: Revitalisierung nach Plasma 1 min. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach Lebend-Tot-Färbung mittels CLSM (Serienaufnahme Fokusebenen im Abstand von 5,2 µm). Vergrößerung 200-fach.

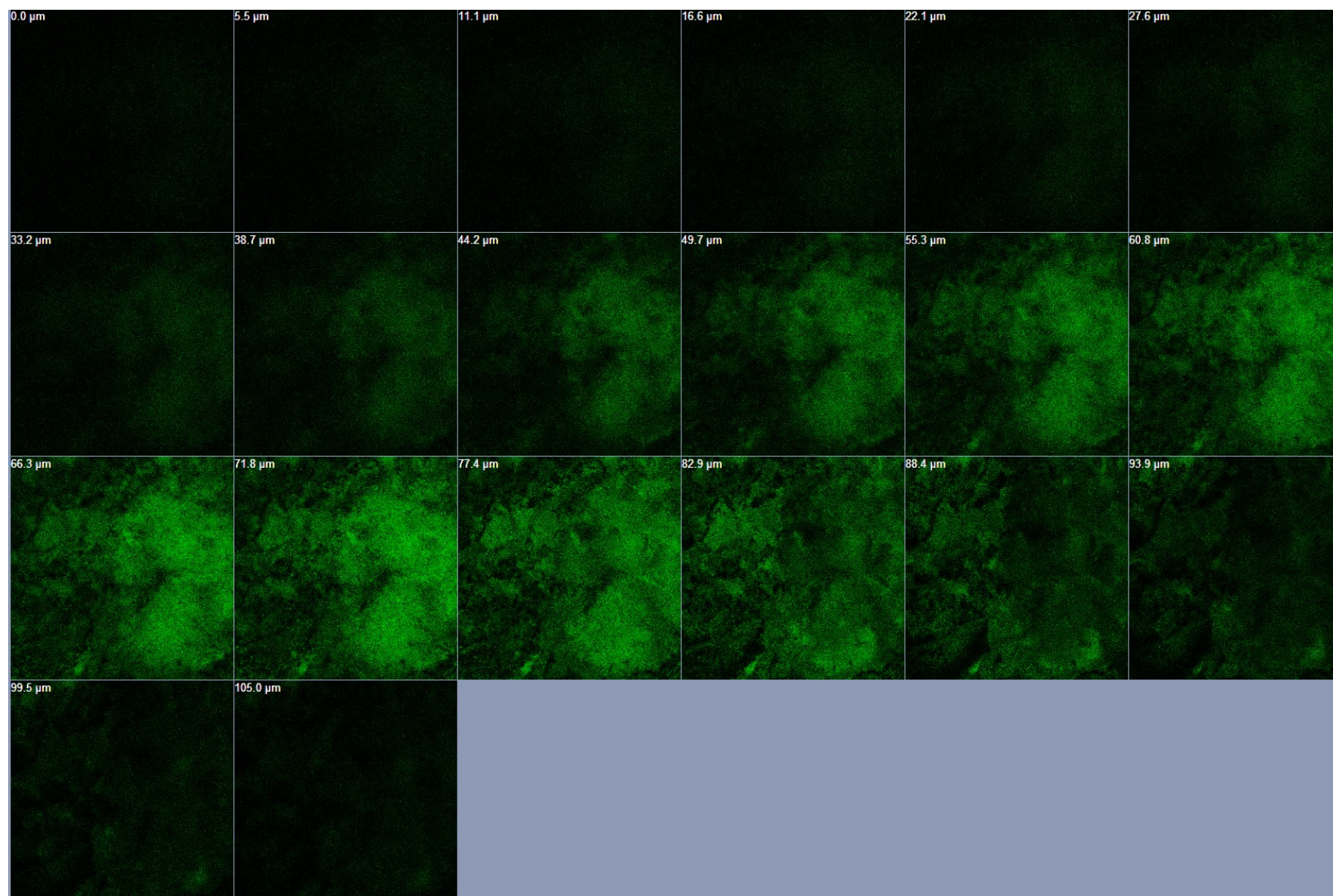


Abbildung 38: Revitalisierung nach Plasma 3 min. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach Lebend-Tot-Färbung mittels CLSM (Serienaufnahme Fokusebenen im Abstand von 5,5 µm). Vergrößerung 200-fach.

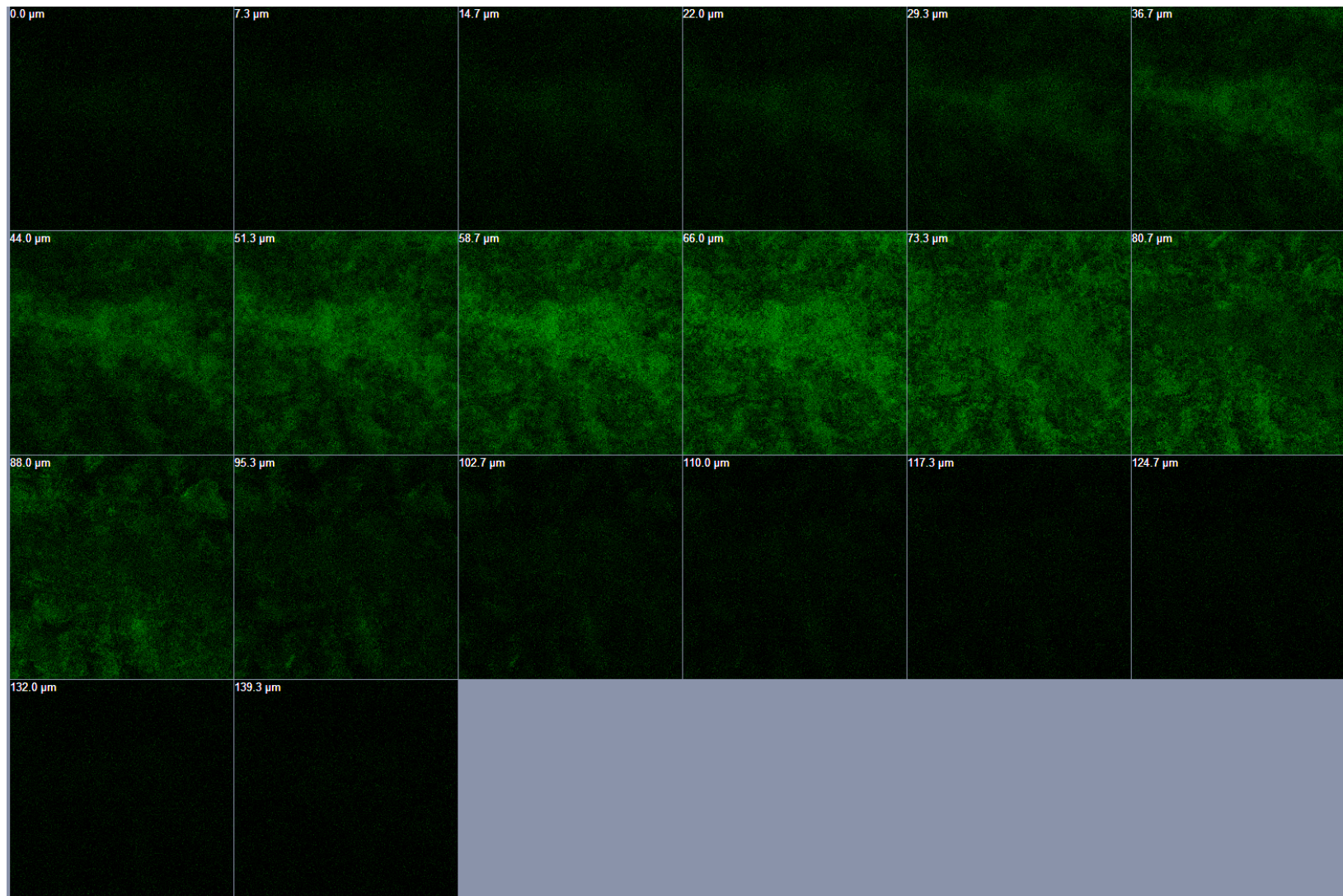


Abbildung 39: Revitalisierung nach Gasmischung 1 min. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach Lebend-Tot-Färbung mittels CLSM (Serienaufnahme Fokusebenen im Abstand von 5,5 µm). Vergrößerung 200-fach.

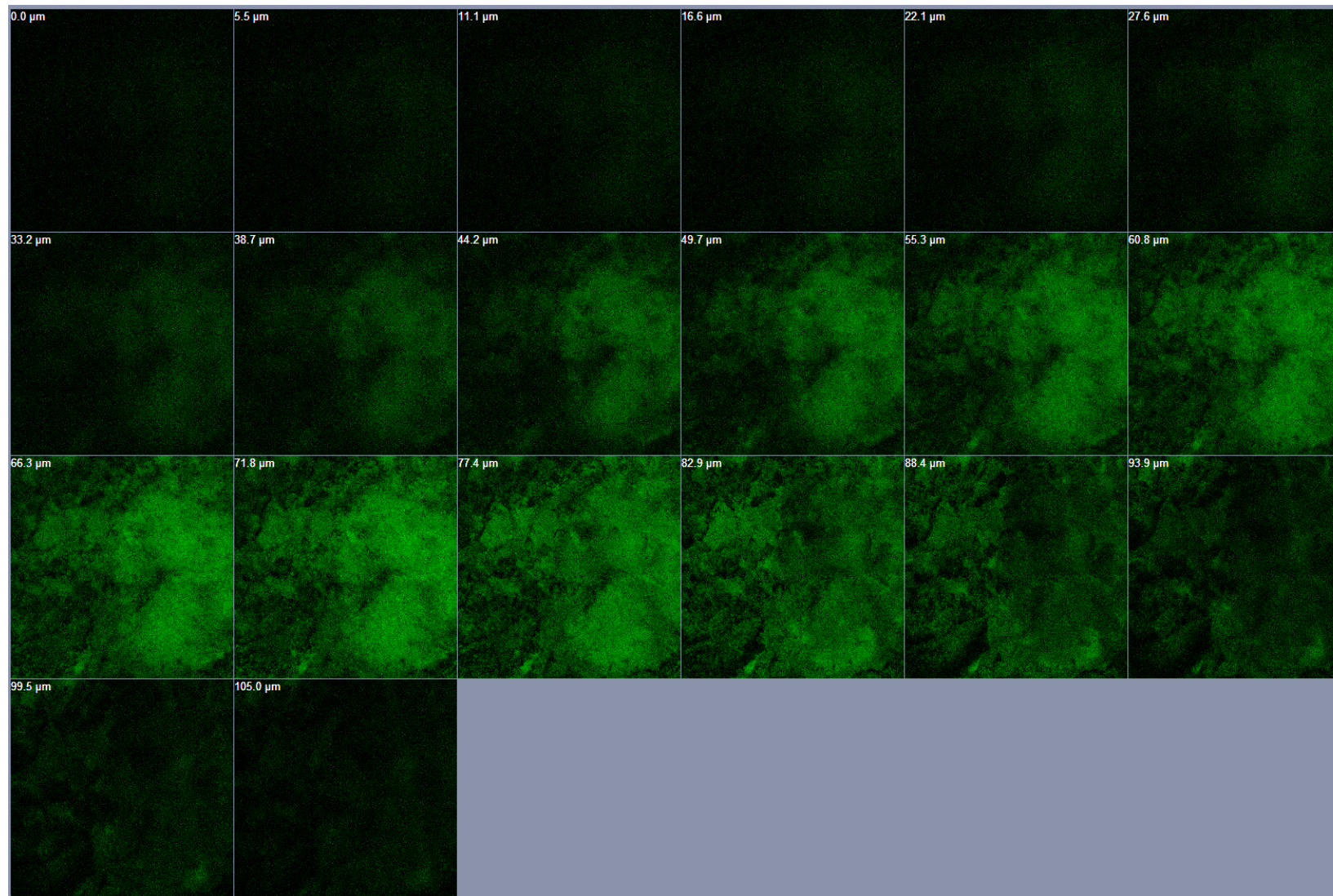


Abbildung 40: Revitalisierung nach Gasgemisch 3 min. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach Lebend-Tot-Färbung mittels CLSM (Serienaufnahme Fokusebenen im Abstand von 5,5 µm). Vergrößerung 200-fach.

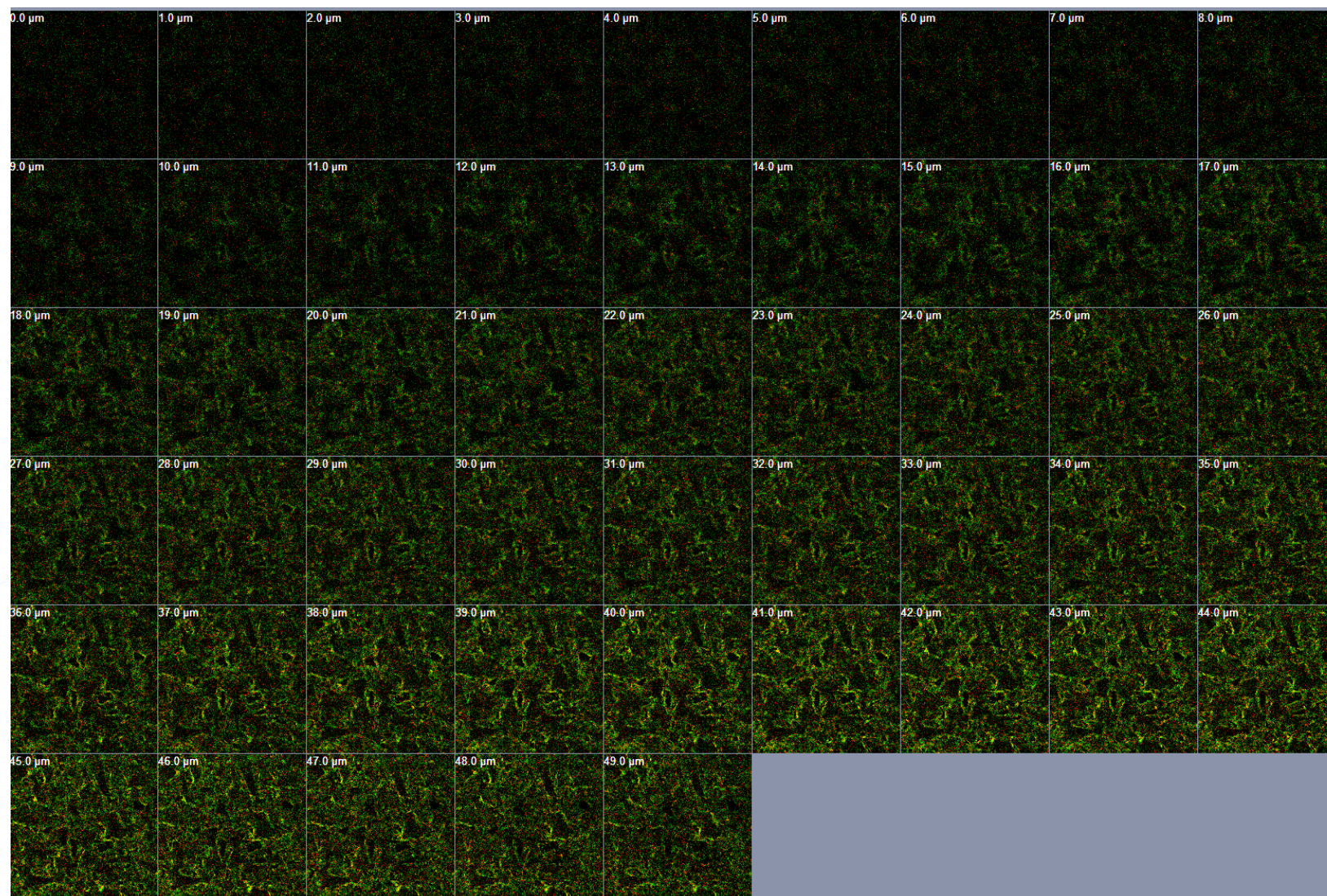


Abbildung 41: Plasma 1 min und Kultivierung mit Gentamicin. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach Lebend-Tot-Färbung (Serienaufnahme Fokusebenen im Abstand von 1 μm). Vergrößerung 200-fach.

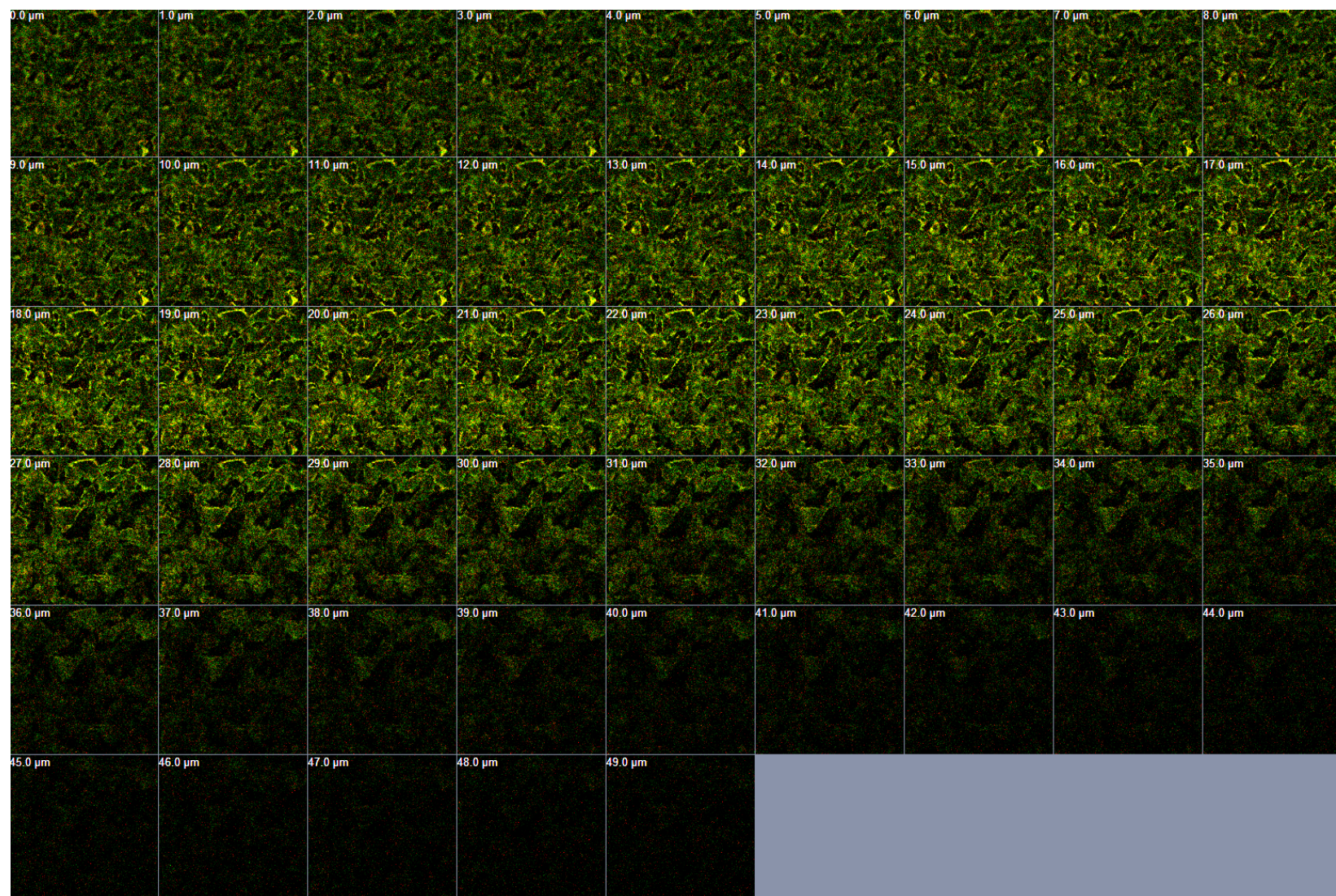


Abbildung 42: Plasma 3 min und Kultivierung mit Gentamicin. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach Lebend-Tot-Färbung (Serienaufnahme Fokusebenen im Abstand von 1 µm). Vergrößerung 200-fach.

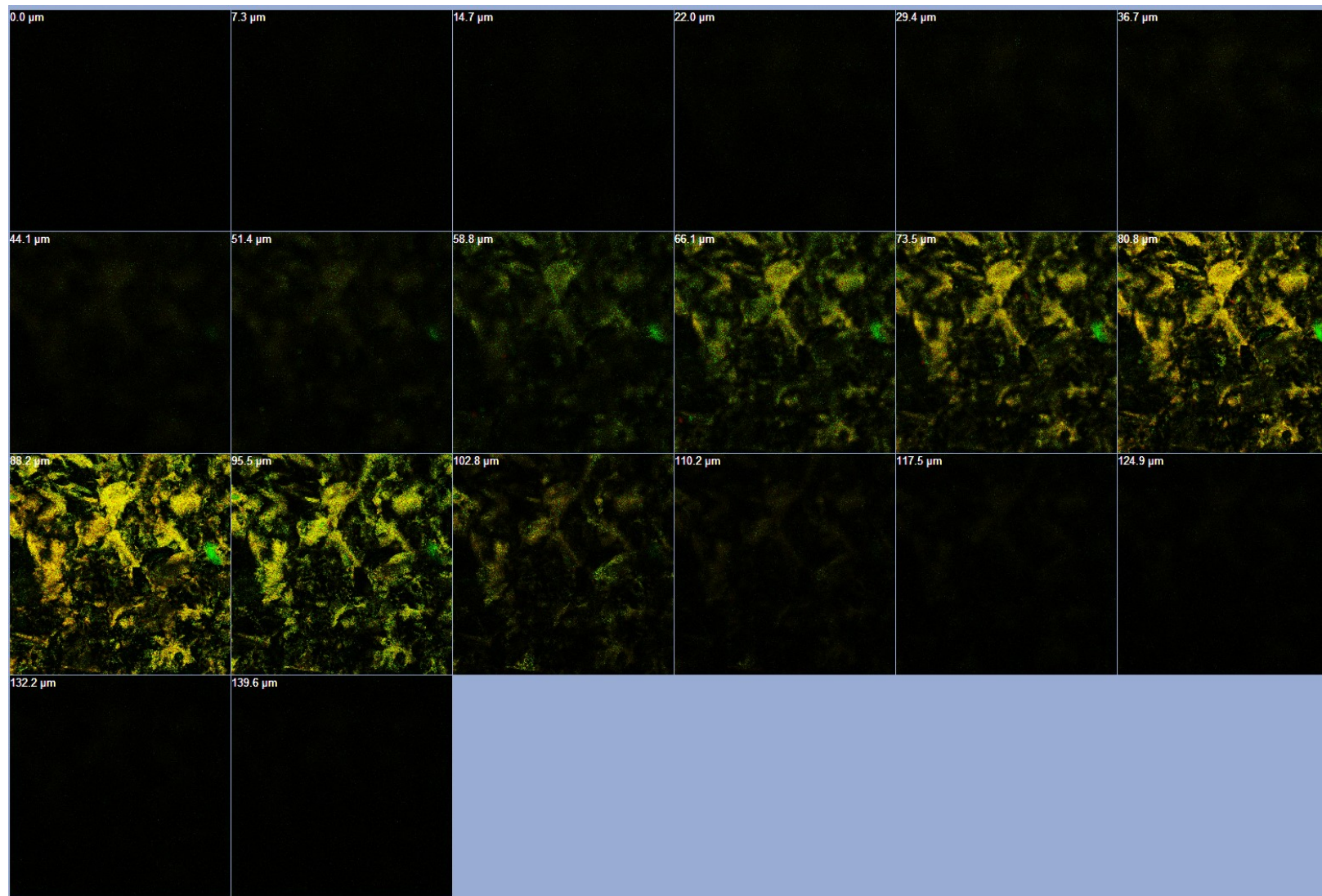


Abbildung 43: Revitalisierung Plasma 1 min und Kultivierung mit Gentamicin. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach Lebend-Tot-Färbung (Serienaufnahme Fokusebenen im Abstand von 7,3 µm). Vergrößerung 200-fach.

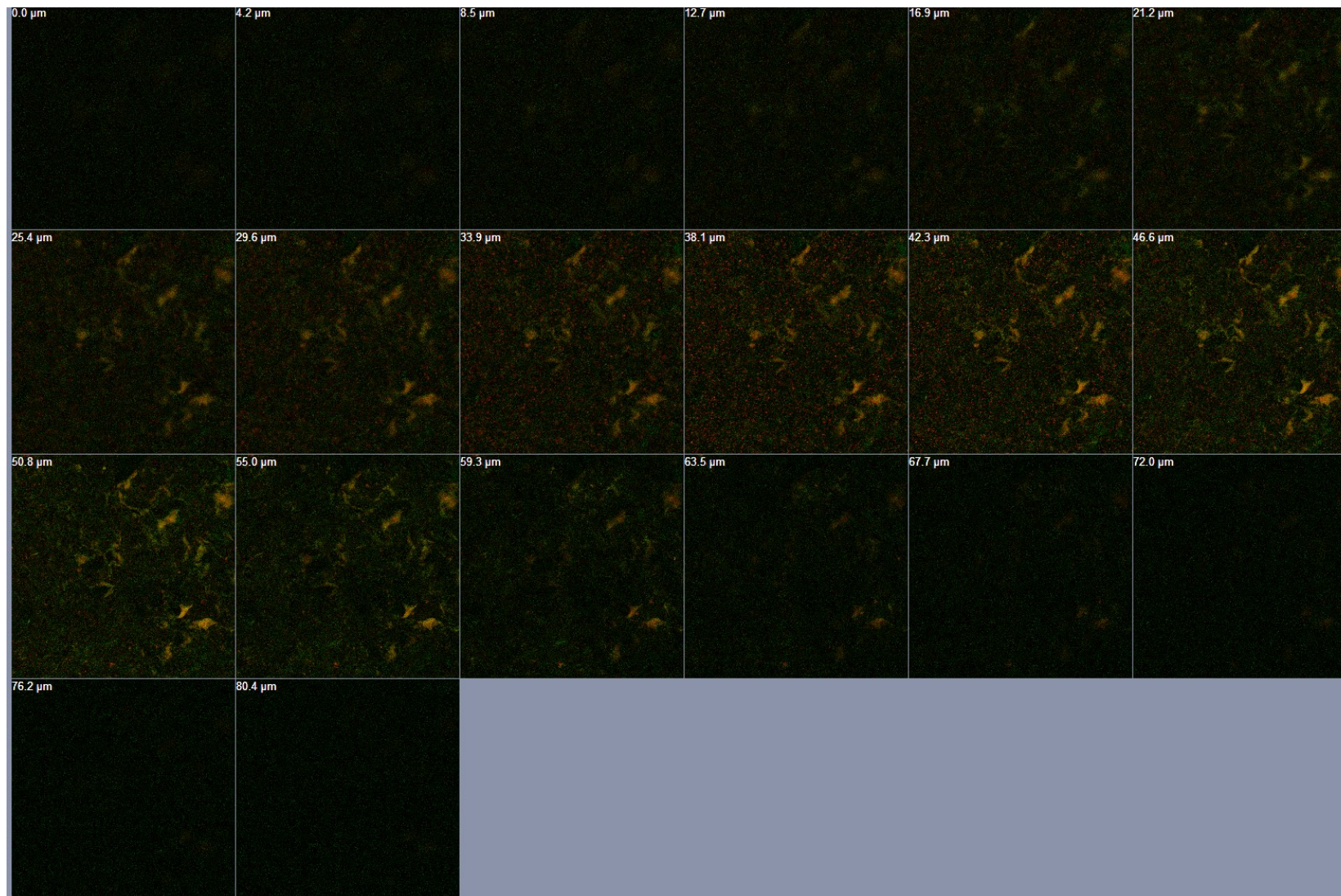


Abbildung 44: Revitalisierung Plasma 3 min und Kultivierung mit Gentamicin. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach Lebend-Tot-Färbung (Serienaufnahme Fokusebenen im Abstand von 4,3 µm). Vergrößerung 200-fach.

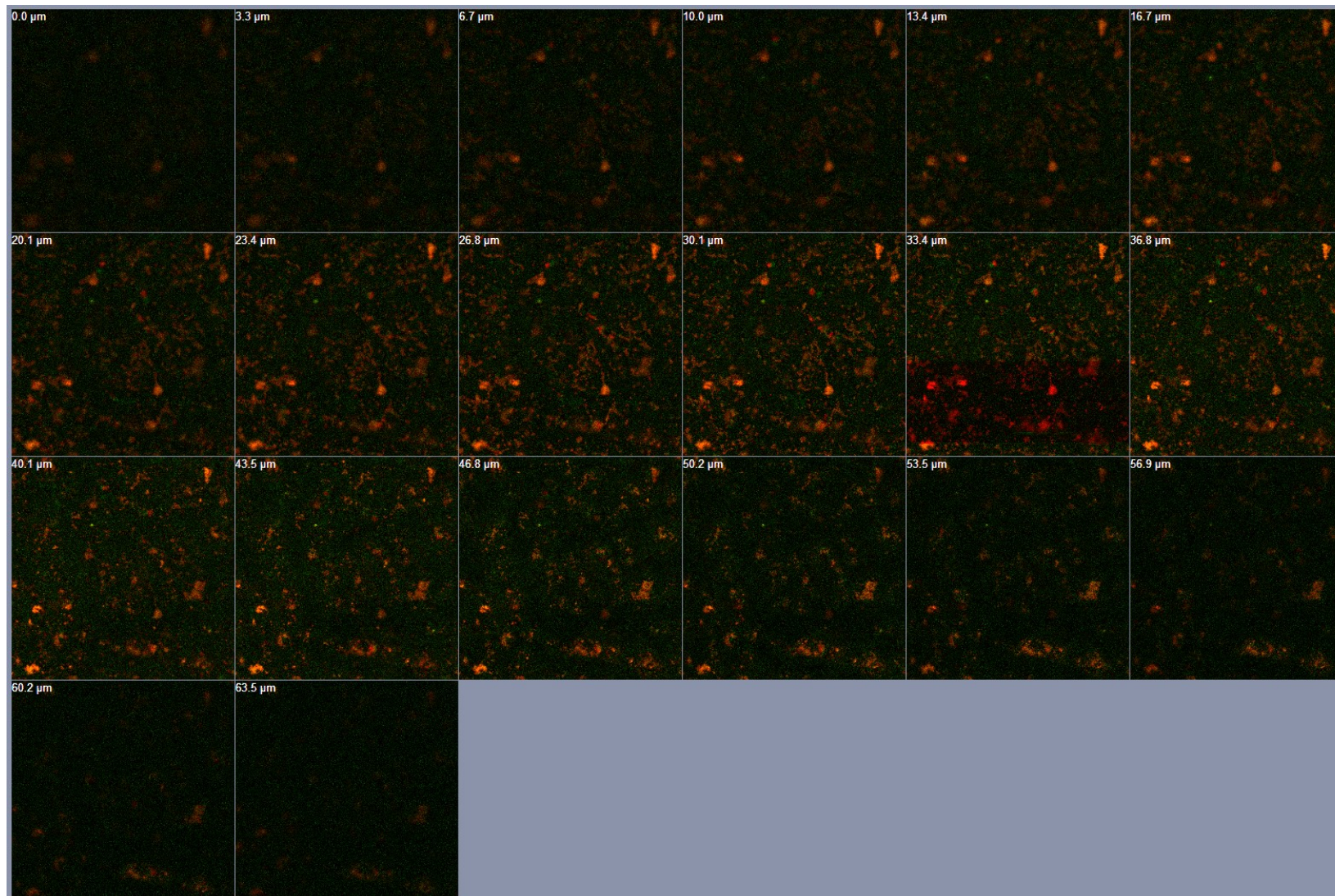


Abbildung 45: Revitalisierung Gasgemisch 1 min und Kultivierung mit Gentamicin. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach Lebend-Tot-Färbung (Serienaufnahme Fokusebenen im Abstand von 4,3 µm). Vergrößerung 200-fach.

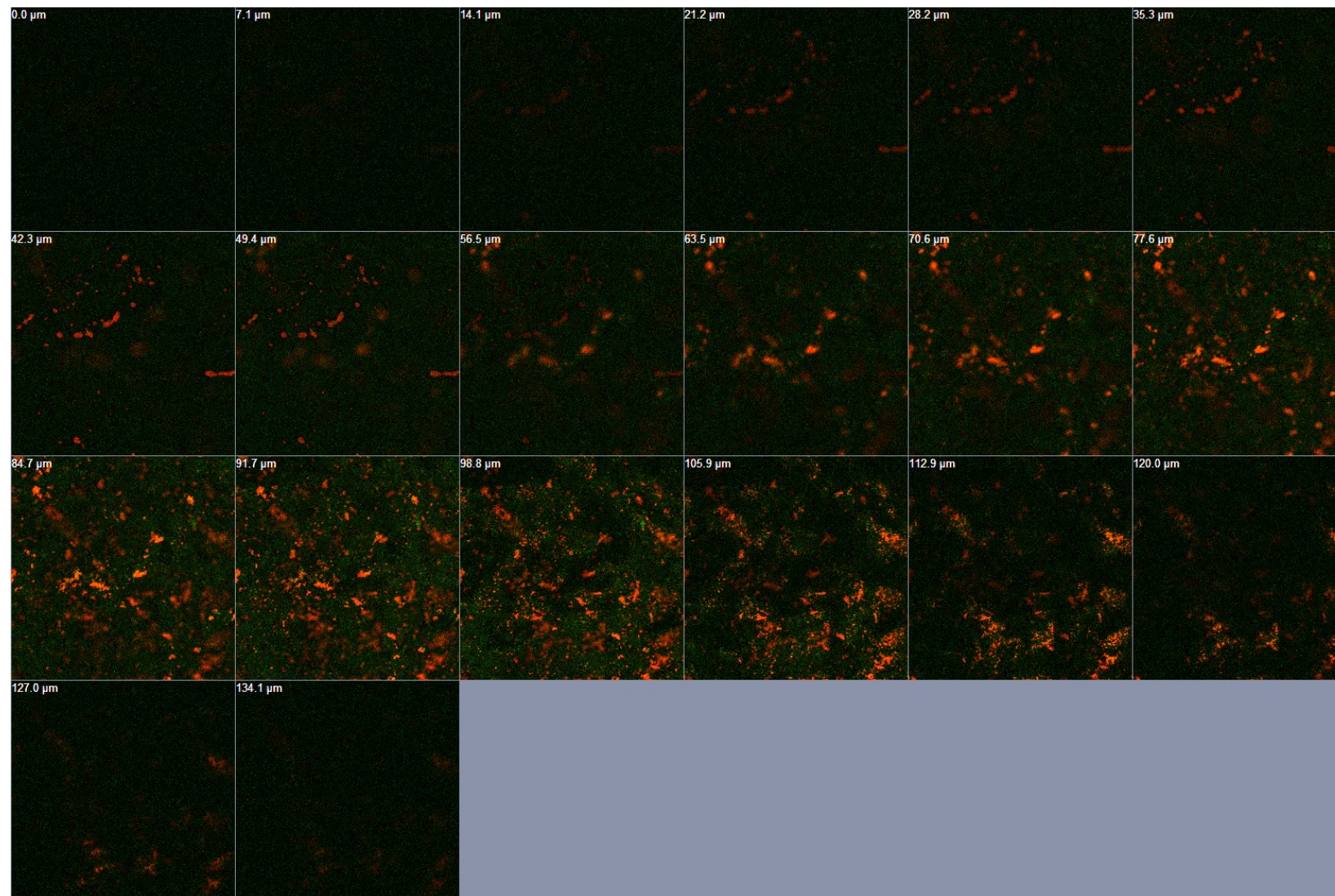
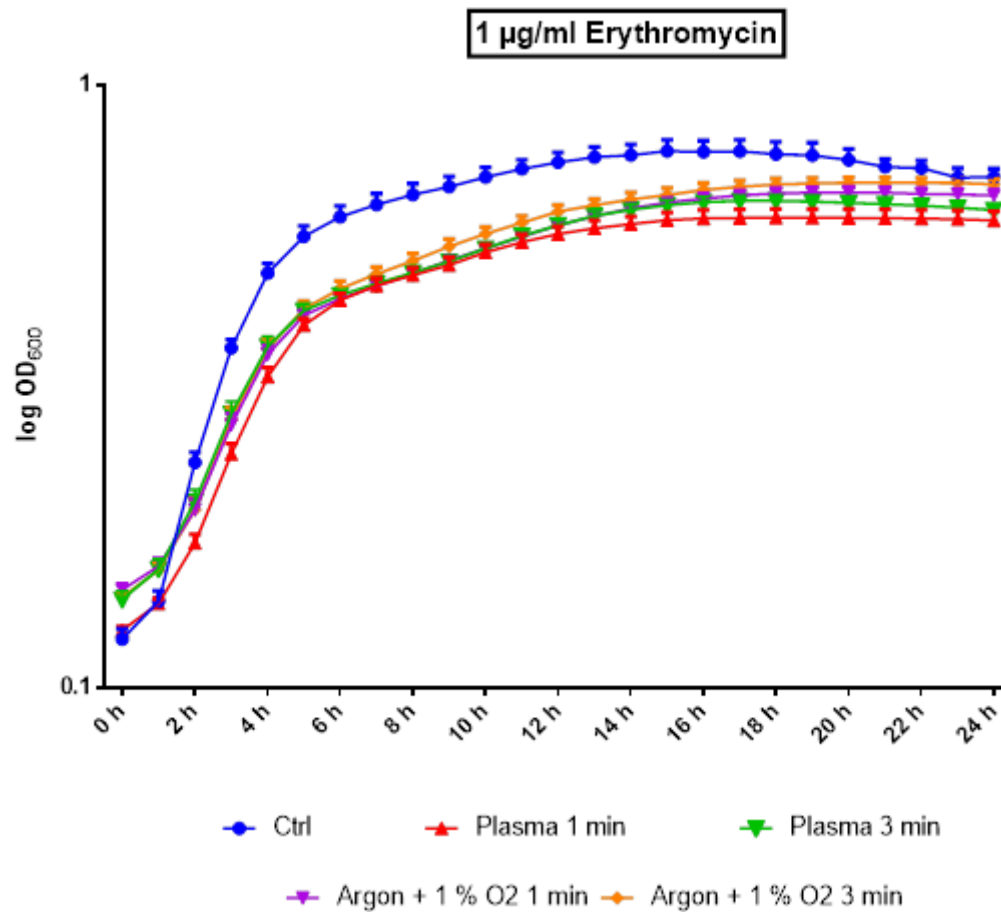
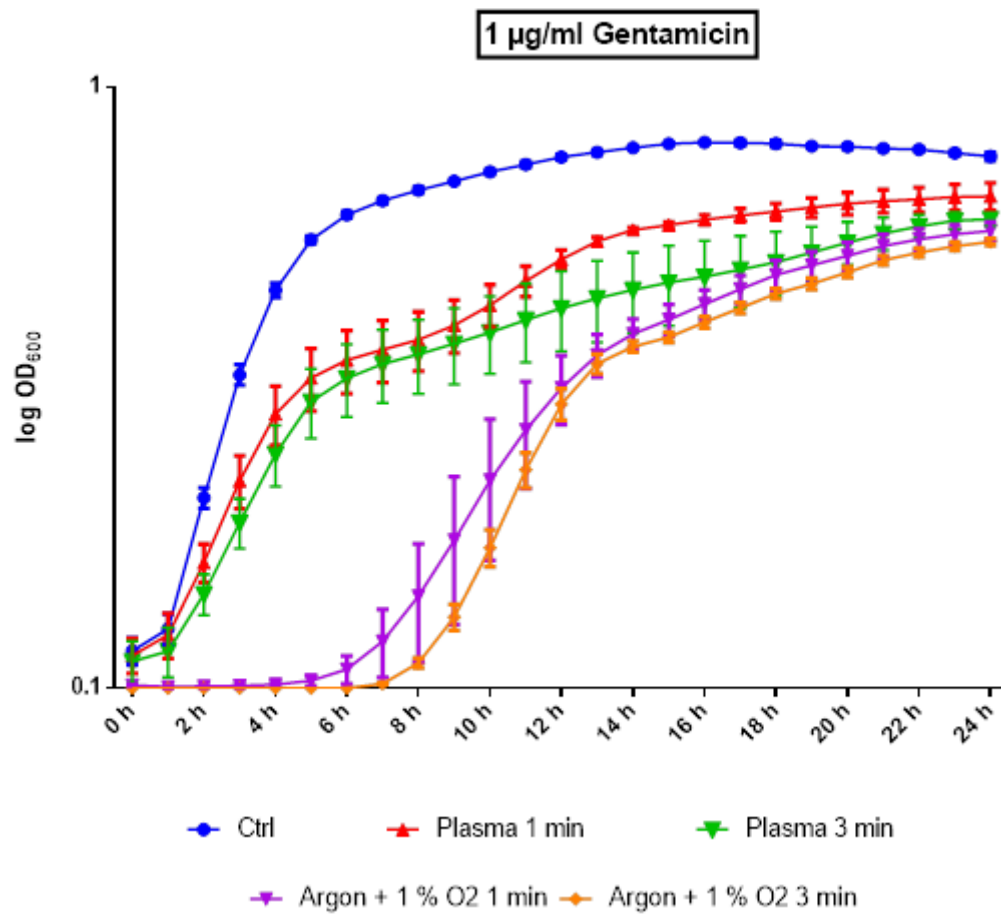


Abbildung 46: Revitalisierung Gasgemisch 3 min und Kultivierung mit Gentamicin. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach Lebend-Tot-Färbung (Serienaufnahme Fokusebenen im Abstand von 4,3 µm). Vergrößerung 200-fach.



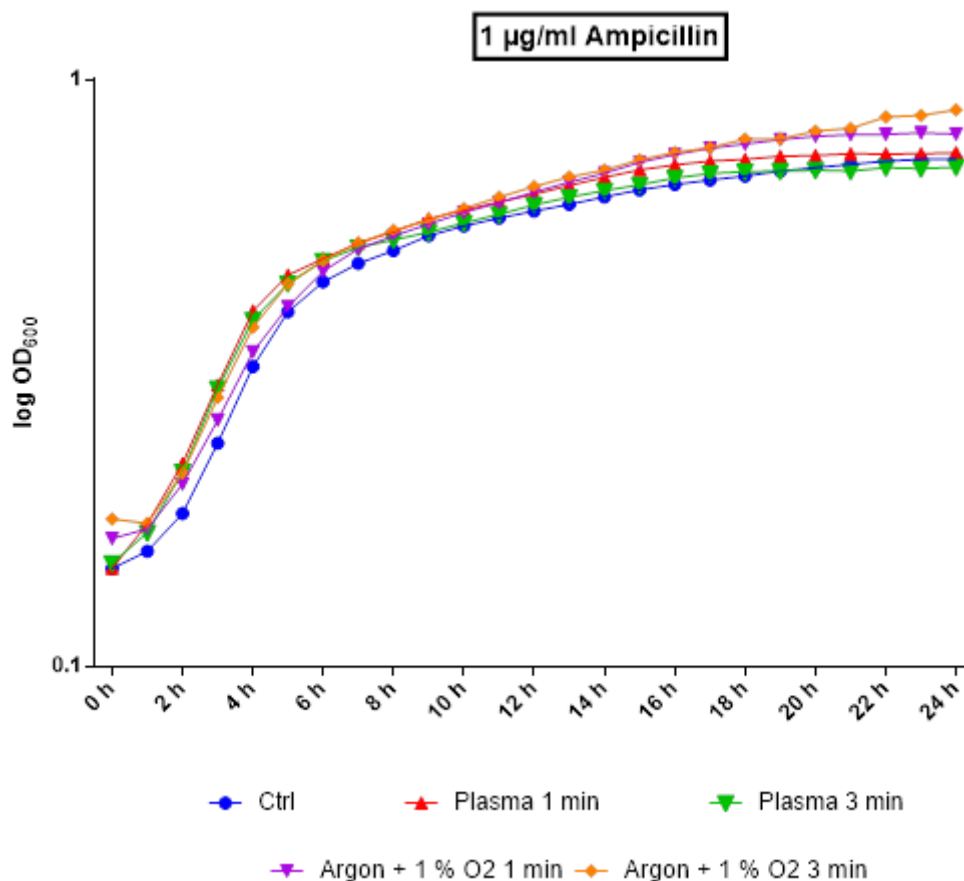
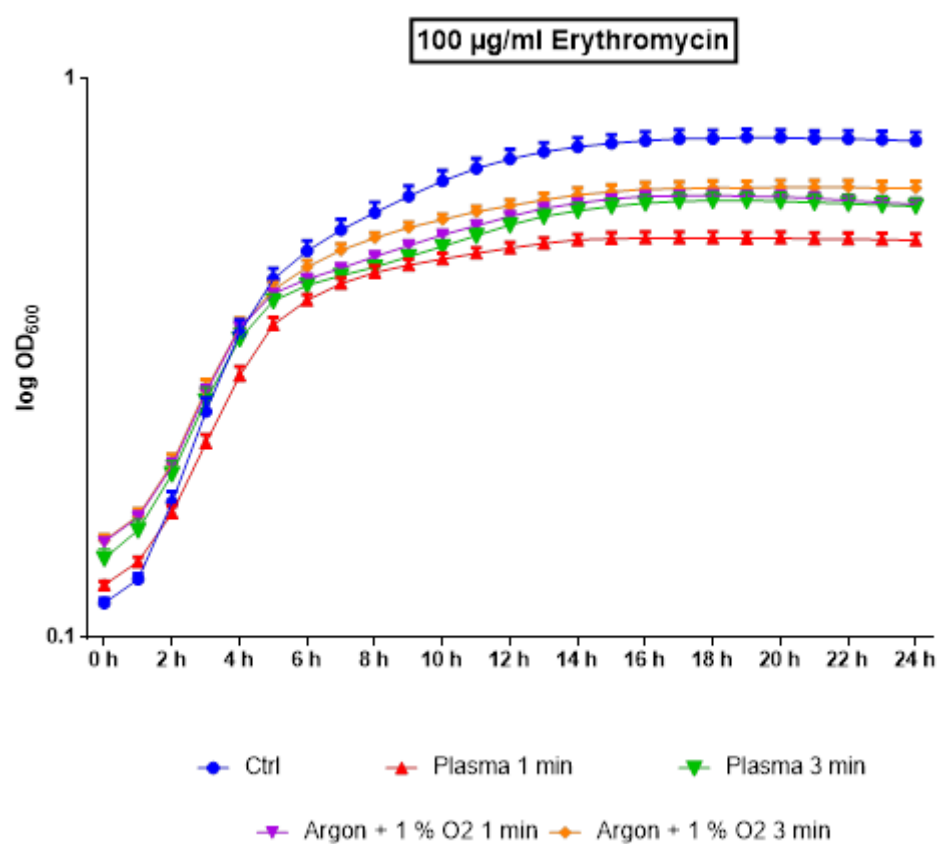
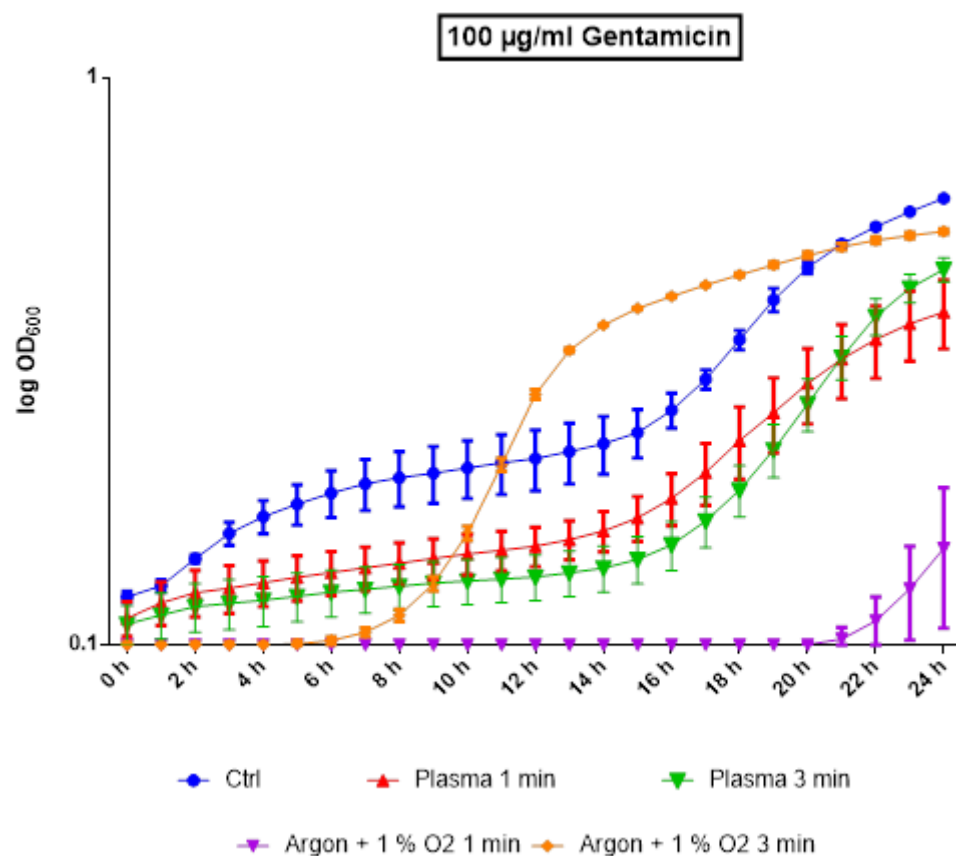


Abbildung 47: Wachstumskinetiken nach Plasma-bzw. Gas-Exposition von *S. epidermidis*. Wachstum in TSB-Medium und 1 $\mu\text{g/ml}$ Gentamicin, Erythromycin oder Ampicillin. Messung der optischen Dichte bei 600 nm. Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (TiAIV). Mittelwert \pm Standardabweichung. $n \geq 6$.



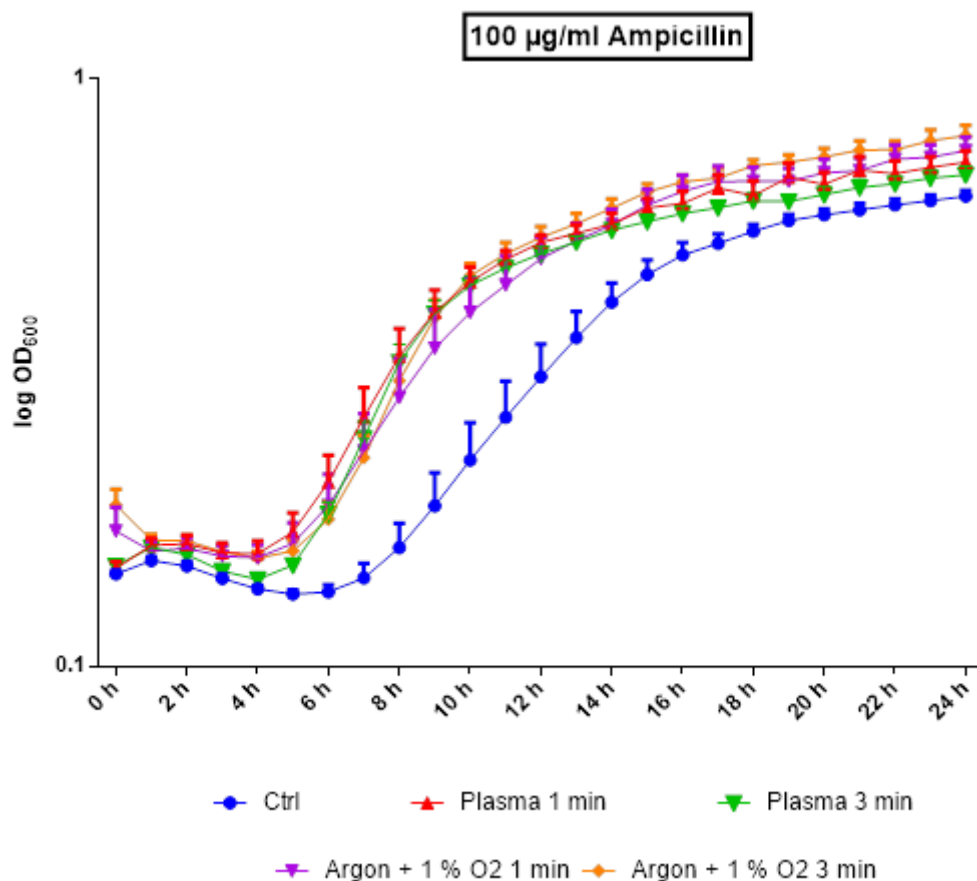
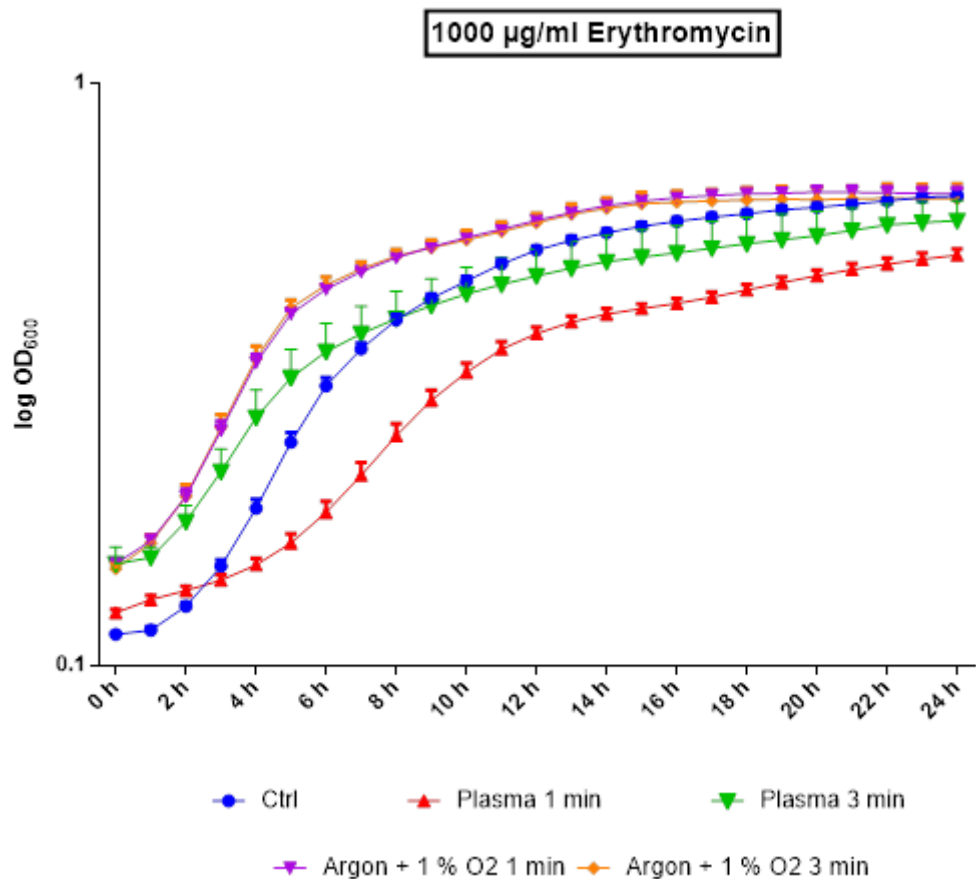
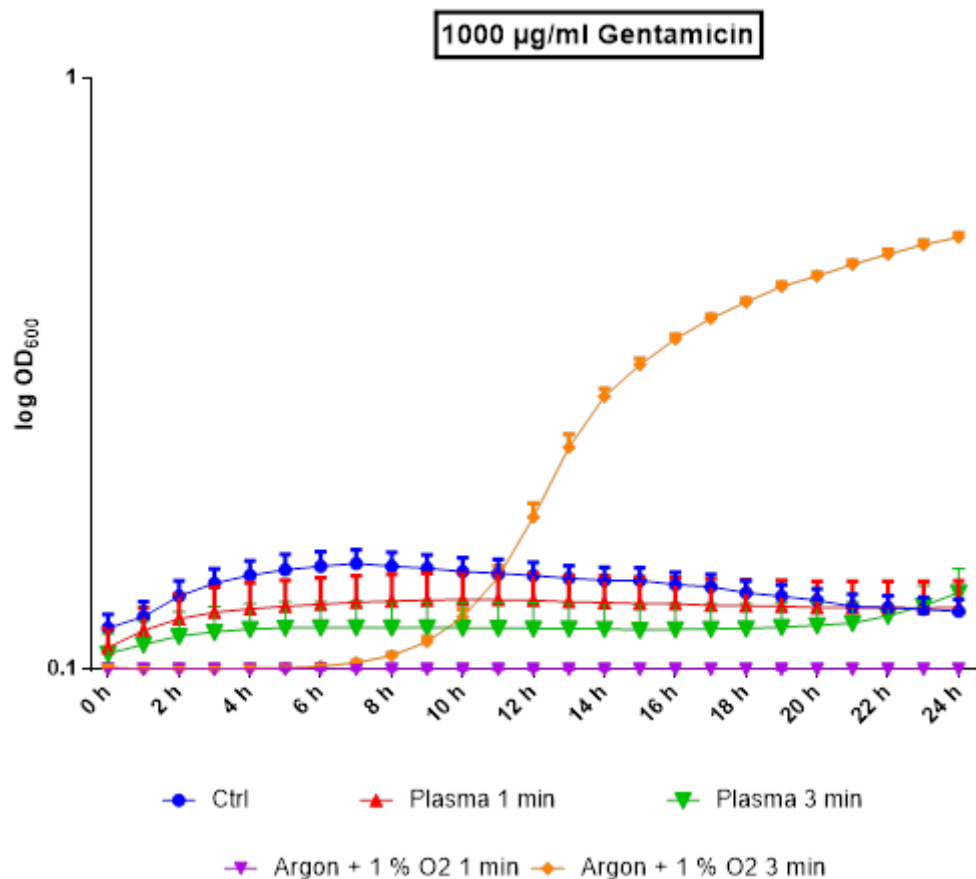


Abbildung 48: Wachstumskinetiken nach Plasma-bzw. Gas-Exposition von *S. epidermidis*. Wachstum in TSB-Medium und 100 µg/ml Gentamicin, Erythromycin oder Ampicillin. Messung der optischen Dichte bei 600 nm. Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (TiAlV). Mittelwert ± Standardabweichung. n≥6.



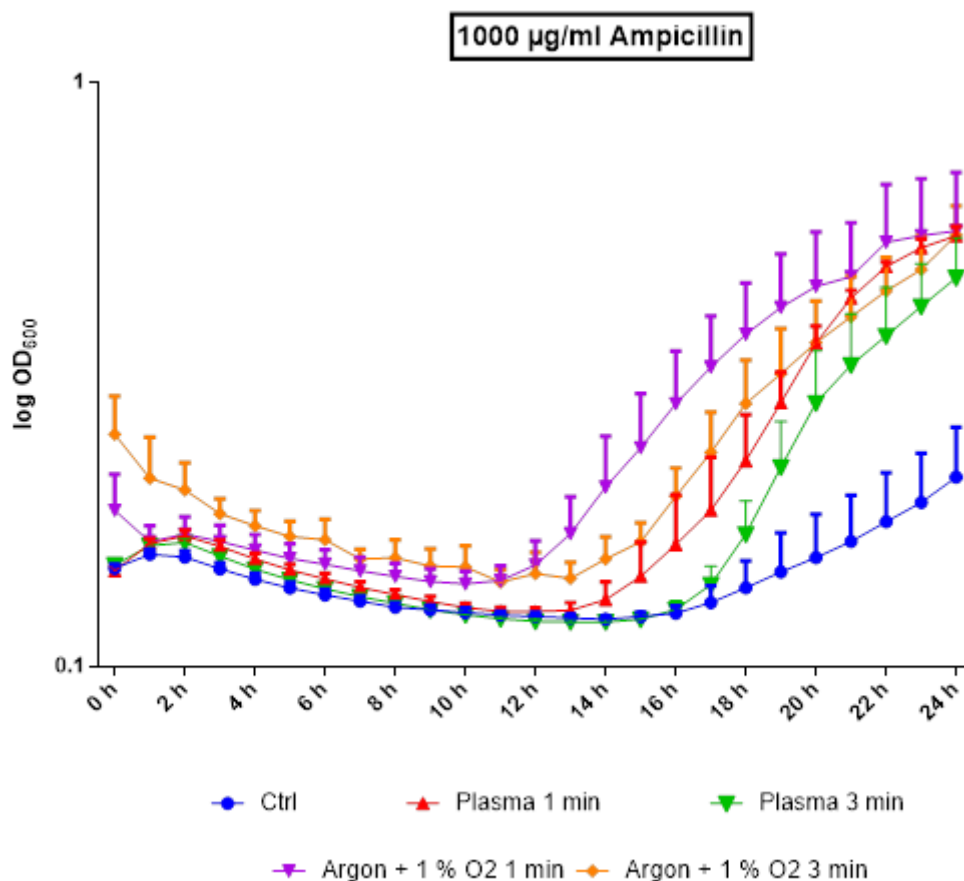
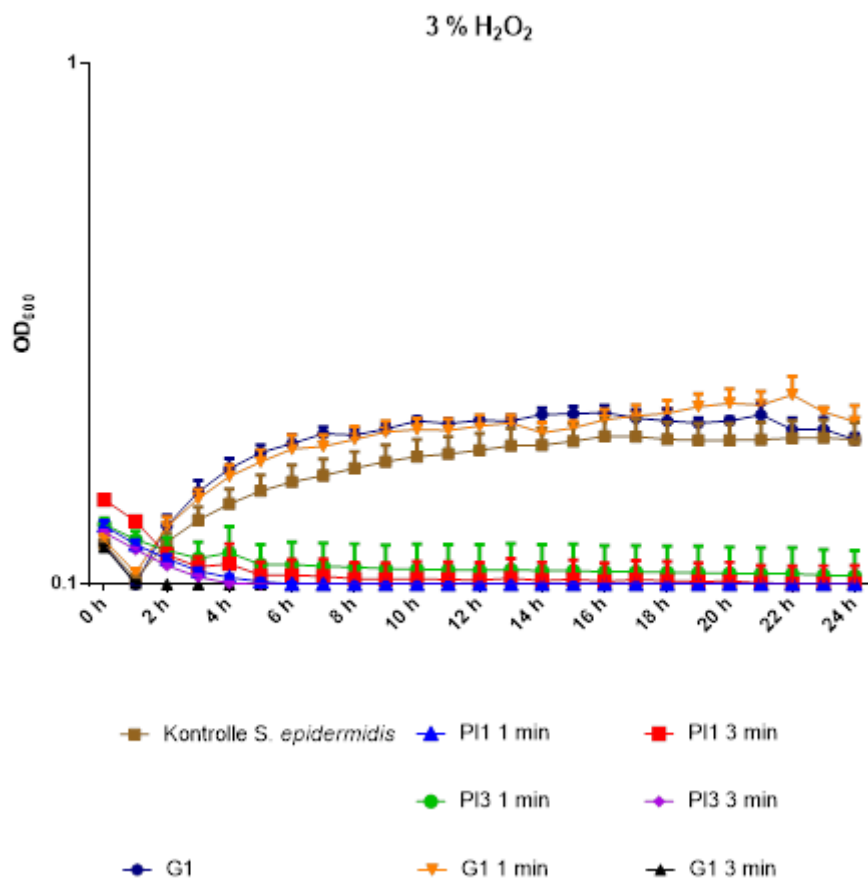
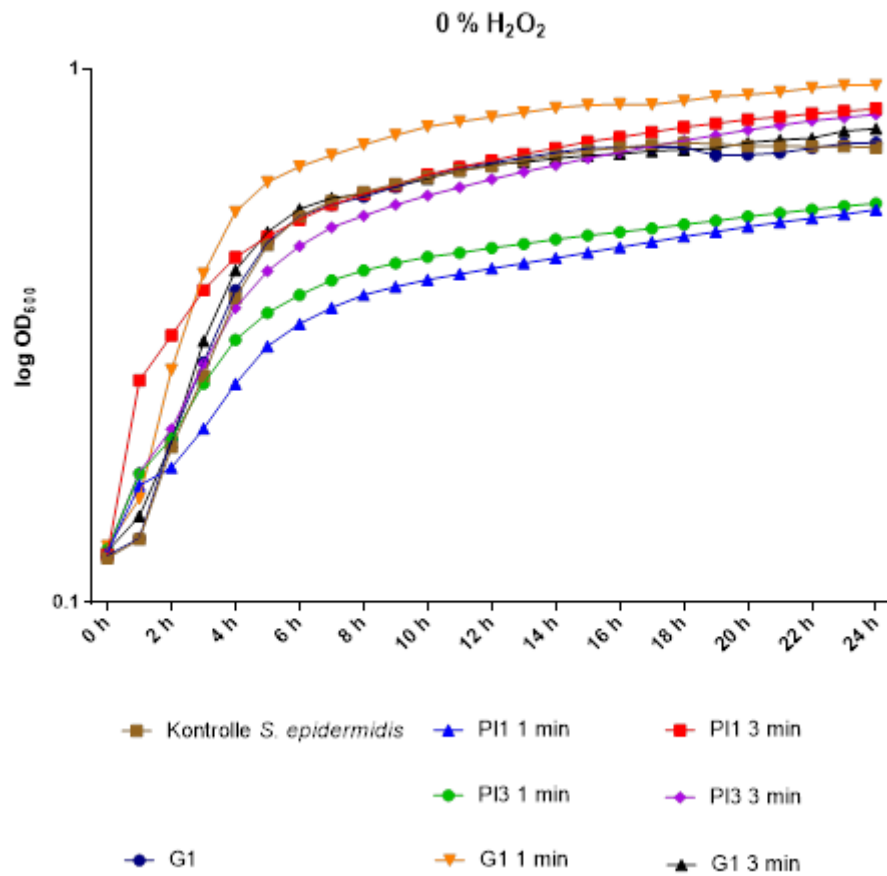


Abbildung 49: Wachstumskinetiken nach Plasma-bzw. Gas-Exposition von *S. epidermidis*. Wachstum in TSB-Medium und 1000 µg/ml Gentamicin, Erythromycin oder Ampicillin. Messung der optischen Dichte bei 600 nm. Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (TiAIV). Mittelwert ± Standardabweichung. n≥6.



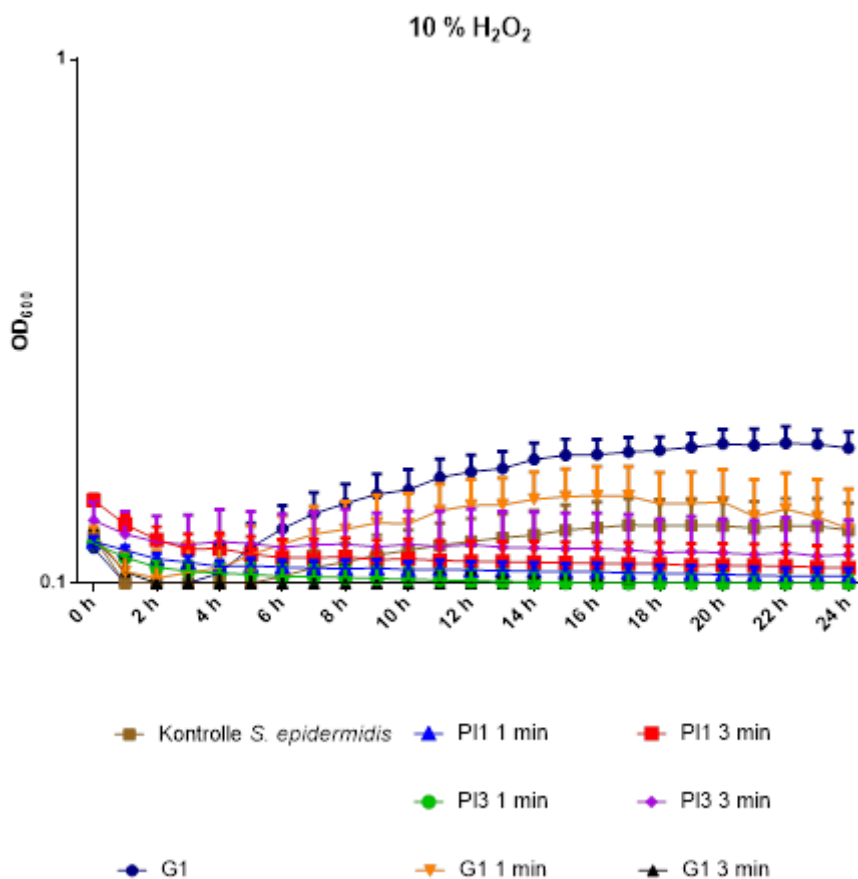


Abbildung 50: Wachstumskinetiken nach Plasma-bzw. Gas-Exposition von *S. epidermidis*. Wachstum in TSB-Medium und 0 % [w/v], 3 % [w/v] bzw. 10 % [w/v] H₂O₂. Messung der optischen Dichte bei 600 nm. Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kontrolle *S. epidermidis*). Mittelwert \pm Standardabweichung. $n \geq 4$.

8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Bernd Kreikemeyer für seine Betreuung meiner Arbeit danken. Danke dafür, dass ich jederzeit in den Laboren des IMIKRO willkommen war und die Tür für mich immer offen stand.

Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Thomas von Woedtke dafür danken, dass ich jederzeit die Räumlichkeiten und Plasma-Quellen am INP Greifswald nutzen konnte. Ohne die Möglichkeit wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Auch danke ich für die guten Ratschläge und Hilfestellungen.

Auch Prof. Rainer Bader sei an dieser Stelle mein Dank ausgesprochen, da er mir das Vertrauen für die Bearbeitung des Projektes „Plasmabiomedizin“ entgegengebracht hat.

Frau Prof. Barbara Nebe danke ich für die Möglichkeit der Bearbeitung meiner Promotion im Rahmen des „GRK Welisa“ sowie für die anregenden Diskussionen während dieser Zeit. Auch danke ich für die Nutzung des CLSMs in der Abteilung für Zellbiologie.

Weiterhin möchte ich Herrn Rüdiger Titze und Frau Christiane Meyer für die überragende praktische Unterstützung während der Plasma-Behandlungen meiner Proben danken. Danke für die zahlreichen Hilfestellungen und Erklärungen und die wunderbaren Gespräche während der Behandlungszeiten.

Meiner lieben Kollegin Dr. Kathrin Duske danke ich für die tolle Zeit während unserer gemeinsamen „Plasma-Touren“, die wunderbaren, anregenden Diskussionen und die Motivation während der gesamten Zeit.

Auch möchte ich meinen lieben Kollegen und Freunden Dr. Sarah Zaatreh, Dr. Robert Jacksteit, Dr. Anett Mau-Möller und Dr. Thomas Dauben für die Motivation und das Anspornen während der gesamten Zeit dieser Arbeit danken.

Meinen lieben Kollegen des Forbiomit und des IMIKRO danke ich für die wunderbare Zusammenarbeit und den Zusammenhalt in den letzten Jahren.

Weiterhin danke ich all meinen Freunden, besonders den Mibi-Bitches und Dr. Anne Köntges, für die emotionale Unterstützung während der gesamten Zeit. Die lieben aufbauenden Worte waren enorme Motivation, vor allem auf den letzten Metern.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern und meinem Bruder für die ewigwährende Unterstützung, die Inspiration und das Vertrauen in mich, dass ich auch diesen Lebensabschnitt meistern werde. Meinem Ehemann Jens danke ich für alles. Danke, dass du für mich da bist und immer an mich glaubst. Danke für deine wunderbare Arbeit während des Korrigierens und Editierens meiner Arbeit.

Selbständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Dazu habe ich keine, außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits in geteilter Erstautorenschaft veröffentlicht in: Duske, Kathrin; **Wegner, Katharina**; Donnert, Monique; Kunert, Ulrike; Podbielski, Andreas; Kreikemeyer, Bernd et al. (2015b): Comparative In Vitro Study of Different Atmospheric Pressure Plasma Jets Concerning their Antimicrobial Potential and Cellular Reaction. In: Plasma Process. Polym. 12 (10), S. 1050–1060. DOI: 10.1002/ppap.201400176.

Rostock, 2018

Katharina Ekat (geb. Wegner)